



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**Diversidade de Orchidaceae e Biosistemática de *Epidendrum ibaguense*  
Kunth na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil**

**SANNA ROCHA NÓBREGA**

**Boa Vista – RR**

**2017**

**SANNA ROCHA NÓBREGA**

**Diversidade de Orchidaceae e Biosistemática de *Epidendrum ibaguense*  
Kunth na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Farias Araújo.

Coorientadores: Dr. Francisco Joaci de Freitas Luz.

Prof. Dr. Christiano Franco Verola.

**Boa Vista – RR**

**OUTUBRO/2017**

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

N825d Nóbrega, Sanna Rocha.

Diversidade de Orchidaceae e Biosistemática de *Epidendrum  
ibaguense* Kunth na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil / Sanna Rocha  
Nóbrega – Boa Vista, 2017.

75 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Farias Araújo.

Coorientadores: Dr. Francisco Joaci de Freitas Luz.

Prof. Dr. Christiano Franco Verola.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de  
Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal.

1 – Biologia reprodutiva. 2 – Citogenética. 3 – Tepui. 4 – Orchidaceae.  
I – Título. II – Araújo, Wellington Farias (orientador). III – Luz, Joaci de  
Freitas (coorientador). IV – Verola, Christiano Franco (coorientador).

CDU – 581.4

Bibliotecária responsável: Marcilene Feio Lima CRB11-507

SANNA ROCHA NÓBREGA

**Diversidade de Orchidaceae e Biosistemática de *Epidendrum ibaguense*  
Kunth na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil**

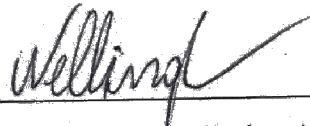
Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Farias Araújo.

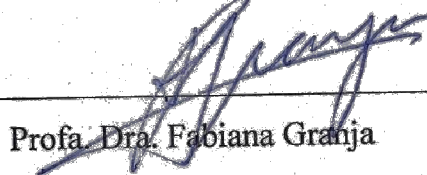
Coorientadores: Dr. Francisco Joaci de Freitas Luz.

Prof. Dr. Christiano Franco Verola.

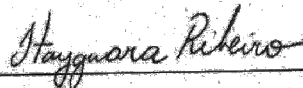
**Banca examinadora**



Prof. Dr. Wellington Farias Araújo



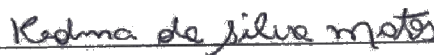
Profa. Dra. Fabiana Granja



Prof. Dr. Itayguara Ribeiro Costa



Dra. Karine Dias Batista



Profa. Dra. Kedma da Silva Matos

**Boa Vista – RR  
OUTUBRO/2017**



## DEDICATÓRIA

À minha família, especialmente ao meu esposo Pedro,  
por apoiarem meus sonhos e aventuras, e me encorajarem a torná-los realidade.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Wellington Farias, pela confiança e apoio durante toda essa árdua jornada.

Ao meu esposo, Pedro Henrique, por me acompanhar em todas as atividades de campo e disponibilizar suas horas de lazer para desenvolver os experimentos de campo comigo.

A pesquisadora Rosemary Vilaça, por abrir as portas do laboratório de Genética da Embrapa Roraima, auxiliando-me e me orientando.

Ao professor Itayguara Costa, pela amizade e confiança, e por me receber no laboratório de Citogenética na UFC, e pelo auxílio nas pesquisas referentes ao tema.

Ao pesquisador Joacir Luz, pela coorientação e apoio de campo, o qual me apresentou a Serra do Tepequém.

Ao professor Christiano Verola, pela coorientação e por me ensinar a admirar essa linda família das Orchidaceae.

A Embrapa Roraima, que disponibilizou a estrutura física para desenvolvimento de parte da pesquisa.

A FAPEAM e a CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao SISBIO, pela autorização para pesquisa (40111-1).

## RESUMO

A família Orchidaceae é uma das maiores dentre as angiospermas, destacando-se o gênero Neotropical *Epidendrum* L. com aproximadamente 1.200 espécies, nas quais há registro de variações morfológicas. Na literatura, o registro de diferentes fenótipos florais está associado à divergência e sugere o isolamento reprodutivo, ocasionando especiação. Em Roraima, na Serra do Tepequém, *E. ibaguense* Kunth apresenta variação na coloração das flores. Com isto, o objetivo deste estudo foi determinar a diversidade de Orchidaceae na Serra do Tepequém, caracterizar os morfotipos de *E. ibaguense* e determinar o número cromossômico dos morfotipos. Entre 2013/2015 em expedições à área de estudo das espécies de Orchidaceae foram fotografadas e coletadas, resultando no registro de 20 gêneros e 34 espécies, o equivalente a 10% da diversidade de Orchidaceae de Roraima. A caracterização fenotípica de *E. ibaguense* foi realizada a partir de uma amostra de 41 indivíduos marcados com placas de PVC, observados mensalmente. O sistema reprodutivo foi estudado através de experimentos de autopolinização e polinização cruzada. Os frutos formados foram coletados e, posteriormente, foi analisada a viabilidade das sementes. Por fim, para análise citogenética foram coletadas amostras do ápice radicular dos diferentes morfotipos. As amostras foram pré-tratadas com 8Hq a 4°C/24h e fixadas em Carnoy a 4°C. Posteriormente, em laboratório, foi utilizado o método convencional para citogenética. Para determinação do número cromossômico e do tipo de núcleo, lâminas foram fotomicrografadas. *Epidendrum ibaguense* apresentou período de floração entre os meses de novembro e fevereiro. A formação de frutos a partir de autopolinização foi de 68%, enquanto que de polinização cruzada foi de 30%. A viabilidade das sementes dos frutos de autopolinização foi de 69% e de polinização cruzada 80%. Através do índice de auto-incompatibilidade (86,6%) determinou-se que *E. ibaguense* é autocompatível quanto ao número cromossômico; houve variação cromossômica intra e interpopulacional, sendo que os morfotipos magenta, rósea e branca apresentaram  $2n= 58$ , enquanto nos morfotipos vermelhos variaram entre  $2n= 72$  e  $76$ . Os núcleos interfásicos foram predominantemente semi-reticulados nos morfotipos  $2n= 58$  e arreticulados em morfotipos  $2n= 72$  e  $76$ . A Serra do Tepequém é uma área rica em espécies de Orchidaceae. Dentre estas espécies, *E. ibaguense* apresenta variações morfológicas significativas entre os morfotipos e variação do número cromossômico apontando indícios de especiação na população estudada.

**Palavras-chave:** Biologia reprodutiva, Citogenética, Tepui, Orchidaceae.

## ABSTRACT

The Orchidaceae family is one of the most numerous among the angiosperms, with the genus Neotropical *Epidendrum* L. showing around 1200 species, with records of morphological variations. In the literature, the occurrence of different floral phenotypes is associated with divergence and suggests reproductive isolation, resulting in speciation. At the Tepequém Mountain, Roraima, *E. ibaguense* Kunth shows variation in flower coloration. Thus, this study aimed to determine the diversity of Orchidaceae at the Tepequém Mountain, to characterize the morphotypes of *E. ibaguense* and to determine the morphotypes' chromosome number. Species of Orchidaceae were photographed and collected between 2013/2015 during expeditions to the study site, resulting in the registration of 20 genera and 34 species, which is equivalent to 10% of Roraima's Orchidaceae diversity. The phenotypic characterization of *E. ibaguense* was performed using a sample of 41 individuals marked with PVC plates, with monthly observations. The reproductive system was studied through self-pollination and cross-pollination experiments. The resulting fruit were collected and analyzed for seeds viability. Finally, for the cytogenetic analysis, samples were collected from the radicular apex of the different morphotypes. Samples were pre-treated with 8Hq at 4°C/24h and fixed in Carnoy at 4°C. Later, a conventional method was used for cytogenetics. To determine the chromosome number and nucleos type, slides were photomicrographed. *Epidendrum ibaguense* showed a flowering period between November and February. Fruit formation rates of 68% and 30% were found for self-pollination and cross-pollination, respectively. Seeds viability of 69% and 80% were found for -pollination and cross-pollination, respectively. *E. ibaguense* was deemed self-compatible for chromosome number through the self-incompatibility index (86.6%); intra and inter-population chromosomal variation was found, with the magenta, pink and white morphotypes showing  $2n = 58$ , while the red morphotypes fluctuated between  $2n = 72$  and  $76$ . The interphase nuclei were predominantly semi-reticulated in morphotypes  $2n = 58$  and unreticulated in  $2n = 72$  and  $76$ . The Tepequém Mountain is an area rich in Orchidaceae species. Among these species, *E. ibaguense* displays significant morphologic variations among its different morphotypes and variation in chromosome number, indicating the occurrence of speciation in the studied population.

**Keywords:** Reproductive biology, Cytogenetic, *Tepuy*, Orchidaceae

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Mapa indicando a localização da Serra do Tepequém no Estado de Roraima, em destaque a vila Tepequém.

**Figura 2.** Paisagens da Serra do Tepequém.

**Figura 1.1.** Landscapes that form the Tepequém. A - Tepequém Mountain Plateau; B - Forest on the banks of Igarapé do Paiva; C - Steppe savannah; D - Savannah near the watercourse of a semi-perennial water; E - Rocky outcroppings; and F- Buritis' Vereda and artificial lakes resulting from the mining activity.

**Figura 1.2.** Orchidaceae species found at Tepequém Mountain, Roraima.

**Figura 2.1.** Distribuição dos agrupamentos de indivíduos de *Epidendrum ibaguense* ao longo da trilha para o Plator na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil.

**Figura 2.2.** Flores dos morfotipos de *Epidendrum ibaguense*: A- Semialba, B- Rósea, C- Magenta, D- Vermelha.

**Figura 2.3.** Sementes de *Epidendrum ibaguense* em aumento de 10X em microscópio óptico. Em A, verifica-se uma semente viável com embrião e, em B, uma semente inviável.

**Figura 2.4.** Frutos de *Epidendrum ibaguense*: abortado (A) e predados (B-C).

**Figura 3.1.** Flower color variation of *Epidendrum ibaguense* on the Tepequém's Tepuy/RR. **A.** magenta flowers; **B.** pink flowers; **C.** white flowers; **D.** terrestrial red flowers from population 1 (1); **E.** rupicolous red flowers from the population 2 (2).

**Figura 3.2.** Metaphasic cells of *Epidendrum ibaguense* showing condensed chromosomes. **A.**  $2n = 58$ , magenta-flowered morphotype; **B.**  $2n = 72$ , terrestrial, red-flowered morphotype (population 1); **C.**  $2n = 76$ , rupicolous, red-flowered (population 2). Type of interphasic nuclei: **D.** semi-reticulated; **E.** non-reticulated.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.1.** List of Orchidaceae species found at Tepequém Mountain, Roraima, predominant habit and vegetation in which the species were found.

**Tabela 2.1.** Dimensões médias das estruturas vegetativas das folhas e hastes de *Epidendrum ibaguense* na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil.

**Tabela 2.2.** Dimensões médias das estruturas das flores de *Epidendrum ibaguense* na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil.

**Tabela 2.3.** Dados obtidos para *Epidendrum ibaguense* na Serra do Tepequém, Roraima.

**Tabela 3.1.** Morphological traits of the vouchers used in the cytogenetic analysis.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
2.1 <i>Roraima e a Serra do Tepequém</i> .....	11
2.2 <i>Florística</i> .....	13
2.3 <i>Ecologia de populações</i> .....	13
2.4 <i>Biologia reprodutiva</i> .....	14
2.5 <i>Citogenética</i> .....	15
2.6 <i>Hibridização</i> .....	17
2.7 <i>Variabilidade genética</i> .....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3.1. OBJETIVO GERAL</b> .....	19
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	19
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
<b>Capítulo 1 - Orchid's diversity at Tepequém's Tepuy, Roraima, Brazil</b> .....	34
<b>Capítulo 2 - Estudo da Biologia Floral e Sistema Reprodutivo de <i>Epidendrum ibaguense</i> Lindl. (Orchidaceae) na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil</b> .....	45
<b>Capítulo 3 - Chromosome variations and diversity of <i>Epidendrum ibaguense</i> Lindl. (Orchidaceae) on the Tepequém's Tepuy, Roraima, Brazil</b> .....	59
<b>6. CONSIDERAÇÃO FINAIS</b> .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

As orquídeas são predominantemente encontradas em regiões tropicais e ocorrem em diferentes ambientes como em campo rupestre, deserto e todos os tipos de florestas, desde o nível do mar até acima de 4.500 m de altitude, porém mais abundantes entre 500 e 2.000m (PABST & DUNGS, 1975, 1977; DRESSLER, 1981; DAHLGREN, et al., 1985). Nesta família existe uma grande variedade de tipos de crescimento ou hábito, sendo que as espécies epífitas são dominantes na região tropical, enquanto que as espécies terrícolas se adensam à medida que se distanciam da linha do Equador (GENTRY, 1988).

No Brasil, encontra-se uma das maiores diversidades de orquídeas das Américas e do mundo, com cerca de 2.500 espécies pertencentes a 220 gêneros (SOUZA & LORENZI, 2008). Portanto, o Brasil é considerado o terceiro país mais rico em diversidade, depois da Colômbia e Equador (PABST & DUNGS, 1975; DRESSLER, 1981) e o principal centro de dispersão, com ocorrência de mais da metade das espécies registradas na América Central e América do Sul (TOSCANO DE BRITO & CRIBB, 2005).

A Floresta Atlântica (1.522 espécies) e a Amazônica (874 espécies), no Brasil, são vegetações de representativa ocorrência da família Orchidaceae (BARROS, et al., 2017). A Floresta Amazônica é constituída de um complexo vegetacional, no qual as orquídeas ocorrem nas diversas tipologias florestais em diferentes níveis de diversidade.

Na Amazônia brasileira foram catalogadas 874 espécies em 154 gêneros de Orchidaceae (BARROS, et al., 2017)) e desde Pabst e Dungs (1975), a bacia Amazônica é considerada a segunda maior província climática em diversidade, com 35% das espécies do país. Em Roraima ocorrem 312 espécies e 111 gêneros, sendo considerado o terceiro Estado da Amazônia brasileira em diversidade de Orchidaceae, e o primeiro é o Amazonas, com 510 espécies, seguido pelo Pará, com 411 espécies (BARROS, et al., 2017).

O gênero *Epidendrum* L. é um dos mais numerosos da subtribo Laeliinae, com cerca de 1.200 espécies (CHASE, et al., 2003; PINHEIRO & BARROS, 2007) distribuídas na América Tropical, dos Estados Unidos à Argentina (DRESSLER, 1993; SILVA & SILVA, 2004), sendo que o centro de diversidade do gênero localiza-se na América do Sul. No Brasil são registradas 139 espécies deste gênero, distribuídas por todas as regiões do país, nos mais variados tipos climáticos e vegetacionais (BARROS, et al., 2017). Apesar da grande diversidade do gênero *Epidendrum*, pouco se sabe a respeito da biologia reprodutiva dessas espécies (PANSARIN, 2003; PANSARIN & AMARAL, 2008a). A maioria dos estudos



envolvendo a investigação do sistema reprodutivo deste grupo não avalia a viabilidade das sementes, desconsiderando a embriologia das sementes para determinar a autocompatibilidade das espécies (GOSS, 1977; PANSARIN, 2003; PANSARIN & AMARAL, 2008a).

Além disso, atualmente a diversidade de espécies pode estar subestimada. No Estado do Ceará, Freitas et al. (2011) registrou 51 espécies, em 32 gêneros, sendo que em uma revisão na lista da Flora do Brasil e na coleção do Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, o número de espécies é ainda maior, cerca de 64. Isso demonstra que a diversidade de orquídeas no Brasil é apenas uma estimativa, especialmente na Amazônia e no Estado de Roraima, onde ainda existem muitas áreas inexploradas. Portanto, são necessários estudos taxonômicos para determinar a real diversidade em nossos ecossistemas.

*Epidendrum ibaguense* Kunth é encontrada do México à América do Sul (SHUTTLEWORTH, et al., 1970). No Brasil, os Estados do Acre, Amazonas, Amapá, Bahia, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro, Roraima e Sergipe apresentam um grande número de exemplares em afloramentos rochosos, podendo variar de 200 a 1.000m de altitude, tanto nas savanas quanto nas florestas (LUZ & FRANCO, 2012; BARROS, et al., 2017). Esta espécie apresenta uma haste longa e característica, com flores, possuindo as mais variadas colorações, e a inflorescência persiste em grande parte do ano. No cultivo, adapta-se em plena exposição à luz do sol, escassez de água e nutrientes. Logo, conclui-se que esta espécie apresenta um grande potencial mercadológico (LUZ & FRANCO, 2012).

Na região noroeste de Roraima, na Serra do Tepequém, os registros de ocorrências de *E. ibaguense* demonstram a ampla diversidade na coloração das flores (LUZ & FRANCO, 2012). Diferentes fenótipos florais podem ser resultado da divergência na espécie e pode levar ao isolamento reprodutivo através da mudança de polinizador, ocasionando a especiação (HODGES & ARNOLD, 1994; KAY & SCHEMSKE, 2003; FENSTER, et al., 2004; GEGEAR & BURNS, 2007; THOMSON & WILSON, 2008). A mutação em genes, frequentemente está relacionada à variação na coloração floral, afetando assim o comportamento dos polinizadores (BRADSHAW & SCHEMSKE, 2003; HOBALLAH, et al., 2007; STREISFELD & RAUSHER, 2009; HOPKINS & RAUSHER, 2011; YUAN, et al., 2013).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Roraima e a Serra do Tepequém*

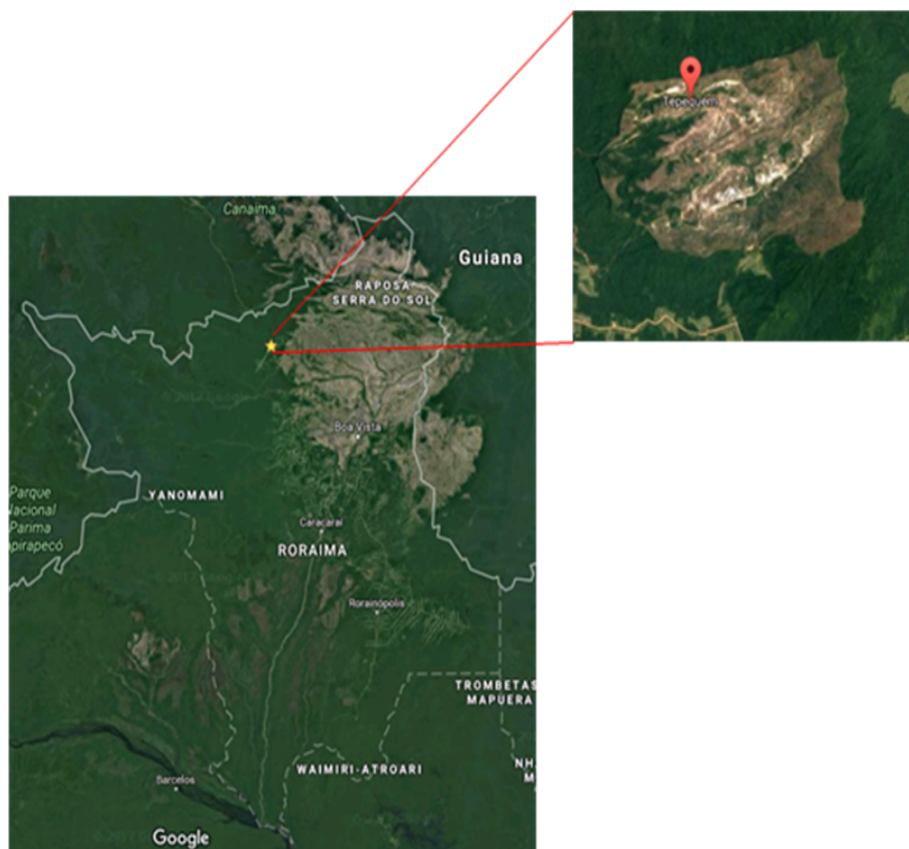
O Estado de Roraima está localizado no norte do Brasil, com superfície de 224.298,980 km<sup>2</sup> (IBGE, 2002), inserido em sua totalidade, no Centro de Endemismo da Guiana e, em parte, no Escudo Guianense (FUNK & HOLLOWELL, 2007). A cobertura vegetacional original é distribuída em diferentes formações florestais e não-florestais, incluindo algumas particularidades como as campinaranas, concentradas ao sul, e os Tepuis, ao norte (BARBOSA, et al., 2003).

As Florestas Ombrófilas predominam com variantes altitudinais que são desde as florestas montanas, sub-montanas, de terras baixas e aluviais (GRIBEL, et al., 2009). Dentre os ecossistemas não florestados, as savanas encontradas em Roraima, também conhecidas como lavrados (VANZOLINI & CARVALHO, 1991), formam as maiores áreas desta vegetação da Amazônia brasileira e compõem o complexo paisagístico “Rio Branco-Rupununi”, que se estende para a Guiana e Venezuela (BARBOSA, et al., 2007). Outro tipo de formação não-florestal encontrada no Estado são as campinaranas, que ocorrem na porção Centro-Sul, e são unidades fitofisionômicas complexas (LISBOA, 1975).

Os Tepuis são um tipo de montanha tabular que possui topo plano e altitudes que podem chegar a mais de 3.000 m. Comuns na Venezuela, também são encontrados nas Guianas e no Brasil, podem ser exemplificados pela serra do Aracá e o pico da Neblina. Na Amazônia Legal os Tepuis representam menos de 2% da região, com alguns cumes na fronteira do Brasil com a Venezuela, como o Monte Roraima e o Monte Caburá e as serras de Uafaranda e Tepequém, em Roraima (MEIRELLES, 2004). Apesar de sua riqueza e diversificação florística, cujo nível de endemismo é extremamente elevado, segundo pesquisadores do Jardim Botânico do Missouri (Estados Unidos) que afirmam que pelo menos 33% (766 espécies) das plantas dos Tepuis são endêmicas desses campos de altitude. Porém, os Tepuis ainda são relativamente pouco estudados no Brasil (BORGES, et al., 2013).

Em uma área limítrofe do Estado de Roraima com a Venezuela, numa zona de transição entre campos e florestas primárias está a Serra de Tepequém (Fig. 1). A paisagem local é composta de um mosaico de ecossistemas (Fig. 2) com predomínio de áreas de Cerrado e Floresta Amazônica, com uma altitude de aproximadamente 1.200 m. A vegetação mostra-se bastante modificada em decorrência das ações antrópicas, caracterizada principalmente pelo garimpo de diamantes, que ocorreu entre 1930 e meados de 1970, com

manchas de florestas sendo encontradas nas nascentes ou nas quedas d'água, e florestas primárias, concentrando-se nas áreas de maior declive, situadas na encosta oeste, conectando-se com a mata que circunda a Serra (BARBOSA, 1992).



**Figura 1.** Mapa indicando à localização da Serra do Tepequém no estado de Roraima, em destaque a vila Tepequém.



**Figura 2.** Paisagens da Serra do Tepequém.

## 2.2 Florística

O levantamento florístico é a principal ferramenta para o conhecimento da vegetação de uma área ou região e para a determinação da diversidade local. A necessidade de realizar estudos de diversidade de espécie está associada aos subsídios que os resultados destes propiciam. Uma vez que, a partir dos dados obtidos é possível desenvolver estudos taxonômicos, fenológicos, fitossociológicos e ecológicos, e com isto planejar políticas de manejo sustentável, bem como definir áreas prioritárias para a conservação.

As monocotiledôneas são um grupo com muitas dificuldades de identificação, seja pela falta de estudos taxonômicos, carência de coletas ou pela ausência e/ou má conservação dos tipos<sup>1</sup> (RODRIGUES, et. al., 2017). Dentro deste grupo, a família Orchidaceae destaca-se por apresentar grande diversidade morfológica que, associada às dificuldades citadas anteriormente, faz com que novos inventários florísticos em áreas e habitats ainda pouco mostrados resultem na determinação de novas espécies, e conseqüentemente, no aumento da diversidade da família (VIEIRA, et. al., 2014).

Levantamentos florísticos que incluam Orchidaceae são importantes, pois além de colaborarem para determinar a real diversidade de espécies desta família, segundo Zotz e Andrade (2002), as orquídeas são bioindicadoras ambientais, uma vez que ocupam nichos especializados, e são sensíveis às interferências antrópicas em matas primárias. Com isso, muitas espécies de Orchidaceae também são utilizadas como bioindicadoras de habitats prioritários à conservação (ICNF, 2017).

Estudos de composição florística que comparem a distribuição das espécies entre diferentes comunidades auxiliam na determinação dos padrões de distribuição das Orchidaceae. Uma das ferramentas utilizadas para a comparação entre a diversidade florística é o coeficiente de similaridade de Sorensen – determinado a partir da equação  $IS = 2a/2a+b+c$ , onde a indica o número de espécies em comum; as comunidades, b e c indicam número de espécies exclusivas de cada área (KREBS, 1989). Este se destaca por considerar com maior peso as espécies que são comuns às áreas em relação às espécies exclusivas de cada área.

## 2.3 Ecologia de populações

Alguns fatores ambientais, tais como alterações das condições ecológicas ao longo dos gradientes de altitude e latitude, quando associados às variações de pluviosidade e das temperaturas ao longo do ano, constituem determinantes eficientes para a abundância e

diversidade de orquídeas nos ecossistemas de florestas tropicais (GENTRY & DODSON, 1987a, 1987b). Tal evidência corrobora com a importância da conservação *in situ*, uma vez que esta possibilita a evolução contínua dentro de ambientes naturais (JAIN, 1975). Entretanto, torna-se imprescindível os estudos de ecologia de populações para uma análise e quantificação precisa destes grupos específicos de indivíduos com ocorrência em uma mesma região e sob a influência de fatores bióticos e abióticos similares (HUTCHINGS, 1997).

Dentre estas análises a distribuição espacial de uma espécie dentro da comunidade é um fator indicativo do grau adaptativo e organizacional da espécie no ecossistema. Características como a forma e o tamanho da população e o tipo de polinizador podem também afetar a variabilidade genética da população, uma vez que populações pequenas estão mais susceptíveis aos efeitos de endogamia, deriva genética e efeitos estocásticos. Estes poderão promover a diferenciação entre populações, a queda da heterozigosidade e redução na variabilidade intrapopulacional (HAMRICK, 1989; HAMRICK & GODT, 1989, 1990).

#### 2.4 *Biologia reprodutiva*

Os sistemas de reprodução influenciam fortemente a variabilidade genética de espécies vegetais, sendo considerados um ponto chave na biologia da conservação (HAMRICK & GODT, 1990). A grande maioria das Orchidaceae são autocompatíveis (van der PIJL & DODSON, 1966; DRESSLER, 1981, 1993; CATLING & CATLING, 1991) e este sistema é bastante flexível, pois plantas isoladas têm a possibilidade da autopolinização, o que se torna um dispositivo importante em eventos de dispersão a longa distância, colonização de outros ambientes e especiação, seja ela por mutação ou hibridização.

Entretanto, a autopolinização tende a ser pouco facilitada devido à presença de uma série de filtros ou barreiras parciais, baseados em mecanismos florais, geralmente anteriores a ocorrência da polinização (van der PIJL & DODSON, 1966; CATLING & CATLING, 1991; TREMBLAY, et al., 2005; LOWRY, et al., 2008; XU, et al., 2012). Em alguns casos, barreiras genéticas, como a presença de alelos recessivos letais, podem evitar que frutos sejam formados através de autopolinização (JOHANSEN, 1990; TREMBLAY, 1994). O estudo de barreiras pré-polinização tem recebido atenção considerável em linhagens de plantas com elevado grau de diversificação floral, tais como as orquídeas (van der PIJL & DODSON, 1966; TREMBLAY, et al., 2005). Conseqüentemente, o papel das barreiras pós-polinização raramente tem sido investigado (SCOPECE, et al., 2007, 2008).

Todavia, a ocorrência da autoincompatibilidade em orquídeas tem sido descrita em diversas espécies de diferentes linhagens, como nos gêneros *Cattleya* Lindl., *Epidendrum* L., *Malaxis* Sol. Ex Sw, *Oncidium* Sw., *Orchis* L., *Pleurothallis* R. Br. e *Stelis* Sw. (EAST, 1940; STORT & MARTIN, 1980; DIERINGER, 1982; ACKERMAN & MONTERO-OLIVER, 1985; AGNEW, 1986; ACKERMAN, 1989; JOHANSEN, 1990; WHIGHAM & O'NEIL, 1991; CHRISTENSEN, 1992; PARRA-TABLA, et al., 2000; ARAGÓN & ACKERMAN, 2001; OH, et al., 2001; BORBA, et al., 2001; TREMBLAY, et al., 2005) e evidencia ser predominante em espécies de Epidendroideae de regiões tropicais (TREMBLAY, et al., 2005).

Estudos sobre biologia reprodutiva das Orchidaceae são importantes, pois auxiliam no melhor entendimento das variações e nos padrões de evolução deste grupo (DODSON, 1962; DRESSLER, 1968; 1981; 1993; van der PIJL & DODSON, 1966), principalmente estudos sobre polinizadores, uma vez que, adaptações morfológicas em resposta a polinizadores específicos são considerados os fatores mais importantes no desenvolvimento e manutenção do grande número de espécies na família (GARAY, 1960; DODSON, 1962; PIJL & DODSON, 1966; FAEGRI & van der PIJL, 1979).

Porém, a maioria dos estudos não considera a viabilidade das sementes, utilizando a equação de Bullock (1985) para determinar a autocompatibilidade de uma espécie. Originalmente o índice de autocompatibilidade é calculado a partir das taxas médias de frutificação por autopolinização e por polinização cruzada. Entretanto, quando considerada a viabilidade das sementes formadas a partir de autopolinização e de polinização cruzada, a mesma equação adaptada considera a taxa de viabilidade das sementes de autopolinização (a), dividido pela taxa de viabilidade de sementes em polinização cruzada (b) vezes 100 ( $IAI = a/b \times 100$ ). Estabelecendo que, quando o índice é menor que 25%, a espécie é considerada autoincompatível.

## 2.5 Citogenética

A família Orchidaceae apresenta uma grande diversidade de números cromossômicos (TANAKA & KAMEMOTO, 1984) e apesar de investigações citogenéticas na família estarem sendo realizadas há muitos anos, estima-se que apenas cerca de 13% de suas espécies são conhecidas quanto ao número cromossômico (FELIX & GUERRA, 2000). Em relação aos estudos de cromossomos de orquídeas da América do Sul, as contribuições mais

importantes foram feitas por Blumenschein (1960), DeMatteis e Daviña (1999), Daviña et al. (2009) e Felix e Guerra (1998, 1999, 2000, 2005, 2010). Quanto às espécies de orquídeas brasileiras, a situação é dramática, em contraste com as 2.500 espécies conhecidas, somente cerca de 3% do número cromossômico é conhecido, contemplando preferencialmente táxons de interesse econômico (VEROLA, 2008).

A variação nos números cromossômicos em orquídeas é bastante elevada, com registros de  $2n=12$  em *Psychmorchis pusilla* (L.) Dodson & Dressler (DODSON, 1957) até  $2n=240$  em *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. ex Lindl. (FELIX & GUERRA, 2010). O predomínio de  $2n=38, 40$  e  $42$  na maioria das orquídeas, e a ocorrência de  $2n=12$  em *P. pusilla* tem sugerido que  $x=6$  é o número básico para a família (BRANDHAM, 1999). Por outro lado, Felix e Guerra (2000, 2005), examinando a variação cromossômica no clado Cymbidioide (*sensu* DRESSLER, 1993) e nas subfamílias Cypridioideae, Orchidoideae (incluindo Spiranthoideae Dressler) e Vanilloideae Szlach sugerem que  $x=7$  é o número básico mais provável para a família. Devido a diversidade e o baixo percentual de número cromossômico estabelecido para as espécies da família, o número básico de cromossomos permanece apenas especulativo.

Essa diversidade cariotípica em Orchidaceae pode ser observada não apenas nos números básicos, como também nos tamanhos dos cromossomos (LEVIN, 2002; GUERRA, 2008), sugerindo que as mudanças no número cromossômico são parte de processos evolutivos em andamento (RAMSEY & SCHEMSKE, 1998). A variação significativa do número de cromossomos observada em *Epidendrum* (PINHEIRO, et al., 2009) e *Cattleya* Lindl. (YAMAGISHI-COSTA & FORNI-MARTINS, 2009) foi causada principalmente por eventos de hibridação e introgressão, processos evolutivos comumente associados à reorganização do número de cromossomos e à evolução por ploidia (RAMSEY & SCHEMSKE, 1998; DOYLE, et al., 2008).

Os intercâmbios de genes entre os taxa com grandes diferenças no número de cromossomos também têm sido observados em *Epidendrum* (PINHEIRO, et al., 2010), desafiando a visão amplamente difundida do "isolamento instantâneo" entre espécies com diferentes números cromossômicos (COYNE & ORR, 2004). Porém, apenas 2,8% de *Epidendrum* spp. foram estudados citologicamente, e estes demonstram a variação do número de cromossomos entre espécies estreitamente relacionadas e entre populações da mesma espécie. A escassez de dados cariológicos para *Epidendrum* dificulta a compreensão da direção da evolução cariológica e outros aspectos das relações filogenéticas deste gênero.

## 2.6 Hibridização

Orchidaceae são particularmente propensas à hibridação devido à ocorrência de muitas espécies simpátricas, e um tipo predominante de sistema reprodutivo autocompatível que anula grande parte das barreiras reprodutivas (PIJL & DODSON, 1966; DRESSLER, 1981, 1993; CATLING & CATLING, 1991; MALLET 2005).

Além disso, a propagação vegetativa e a poliploidia podem contribuir para a estabilização e estabelecimento de muitos destes híbridos (HEDRÉN, et al., 2007). Nas regiões tropicais os indivíduos de morfologia intermediária ocorrem em muitas populações, formando zonas híbridas. Um dos exemplos mais conhecidos de hibridação no processo evolutivo é o gênero *Epidendrum* (HÁGSATER & SOTO, 2005; PANSARIN & AMARAL, 2008b; PINHEIRO, et al., 2009). Como já mencionado, trata-se do maior gênero Neotropical de Orchidaceae para o qual a hibridação foi sugerida como hipótese para justificar os altos níveis de diversidade morfológica observada e a existência de espécies crípticas, ou seja, espécies que não se distinguem morfológicamente, mas estão isoladas reprodutivamente. No entanto, apesar desta hipótese generalizada de que a hibridação é frequente, estudos considerando este aspecto são raros, tendo como referência Pinheiro et al. (2010).

Na hibridação ocorre a fusão de gametas geneticamente diferentes, que resulta em indivíduos híbridos heterozigóticos para um ou mais locos. Através destes eventos surgem novas linhagens que podem apresentar características adaptativas às variações bióticas e abióticas do ambiente, assim possibilitando a perpetuação e sobrevivência da espécie. A hibridização é reconhecidamente um modo de especiação rápida que originou um elevado número de espécies (ANDERSON & STEBBINS, 1954; BLUMENSCHHEIN, 1960; BRIEGER, 1960). Nos estudos referentes às Orchidaceae, com origem em região Neotropical, é amplamente aceita que a formação de híbridos viáveis contribuiu para a grande diversidade desta família (BLUMENSCHHEIN, 1960; van der PIJL & DODSON, 1966; PANSARIN & AMARAL, 2008 a).

O papel da hibridização na especiação é aparentemente comum, pois estudos sugerem que pelo menos 40% das espécies de plantas podem ter surgido a partir deste processo (ELLSTRAND & SCHIERENBECK, 2000; SEEHAUSEN, 2004; MALLET, 2005; MALLET, 2007; RIESEBERG & BAACK, 2007; ARNOLD, et al., 2012; ABBOTT, et al., 2013).

Adicionalmente a este aspecto construtivo, no qual a hibridação pode originar novas linhagens, a introgressão de genes também poderá aumentar a variabilidade genética



(WENDT, et al., 2002; BAACK, et al., 2005), mas pode também levar à assimilação genética dos seus congêneres (RHYMER & SIMBERLOFF, 1996). Com o advento da tecnologia de estudos genômicos e as técnicas de sequenciamento, é possível avaliar a variabilidade genética e diferenciar as espécies. Por exemplo, a partir da comparação entre sequências gênicas de uma espécie. Atualmente, a disponibilização de sequências em bancos públicos na internet, como o GenBank, possibilita o acesso a dados gerados em laboratórios de todo o mundo. As ferramentas moleculares têm um importante papel para a compreensão dos processos naturais determinantes da diversidade de espécies e no desenvolvimento de técnicas que permitem a conservação e o conhecimento da biodiversidade do planeta.

## 2.7 Variabilidade genética

O conceito de biodiversidade abrange três níveis fundamentais: ecossistemas<sup>2</sup>, espécies<sup>3</sup> e genes<sup>4</sup> (Convenção sobre Diversidade Biológica, [www.cbd.int/convention/text/](http://www.cbd.int/convention/text/)). O nível do gene corresponde à diversidade genética dentro da espécie, compõe parte integral da biodiversidade, sendo importante para a preservação do potencial evolutivo das espécies e para o funcionamento do ecossistema (TABERLET, et al., 2012).

A diversidade genética, no entanto, recebeu menos atenção na avaliação da biodiversidade do que a diversidade de ecossistemas e espécies (LAIKRE, et al., 2009), apesar de estudos que demonstram claramente a importância da diversidade genética para a aptidão e persistência das populações (FRANKHAM & RALLS, 1998; SACCHERI, et al., 1998). A diversidade genética dentro das espécies de plantas dominantes aumenta a resistência do ecossistema a perturbações (HUGHES & STACHOWICZ, 2004) e recuperação após extremos climáticos (REUSCH, et al., 2005). Além disso, promove a produtividade primária e, portanto, a diversidade das comunidades de artrópodes herbívoros e predadores (CRUTSINGER, et al., 2006).

Do ponto de vista populacional, uma das teorias da genética de populações prevê a interrupção da conectividade genética quando as populações se tornam pequenas e estão fragmentadas ou geograficamente isoladas. O tamanho reduzido da população e o maior

<sup>2</sup> Ecossistema é o conjunto de todos os organismos que habitam em um determinado espaço e os fatores abióticos desse espaço interagindo entre si.

<sup>3</sup> Espécie é o conjunto de indivíduos semelhantes capazes de se reproduzirem naturalmente, originando descendentes férteis.

<sup>4</sup> Gene é a unidade fundamental da hereditariedade, uma sequência de nucleotídeos localizada em uma posição particular em um cromossomo que codifica um produto funcional específico.

isolaento também podem perturbar o sistema de reprodução, com redução do número de parceiros disponíveis, aumento dos níveis de autofecundação para espécies autocompatíveis e subsequentes reduções nos níveis de sucesso e aptidão reprodutivos à descendência através de depressão por endogamia (AGUILAR, et al., 2006; NOSIL, et al., 2008; ECKERT, et al., 2010; JACQUEMYN, et al., 2012; MILLAR, et al., 2014).

Variações genéticas adaptativas em resposta à variação ambiental ajudam a compreender o potencial de adaptação evolutivo (HOFFMANN & WILLI, 2008). Avanços técnicos na triagem genômica para numerosos loci moleculares espalhados ao longo dos genomas nos permitem identificar variações genéticas ligadas ao meio ambiente (MANEL, et al., 2012). Com a comparação de marcadores nucleares biparentais herdados é possível esclarecer a importância relativa dos genes no fluxo polínico mediada por sementes e pólen, com profunda influência na estrutura de populações naturais (PETIT, et al., 2005; DUMINIL, et al., 2007). Pouco se sabe sobre a capacidade de dispersão de espécies que habitam locais ambientalmente adversos (PINHEIRO, et al., 2011). Através da utilização de marcadores nucleares é possível determinar o contexto filogeográfico de uma população ou entre espécies vegetais (KING, et al., 2009; PALMA-SILVA, et al., 2009) gerando esclarecimento sobre as espécies destes ecossistemas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar a diversidade de Orchidaceae da Serra do Tepequém, Amajari – RR, e caracterizar os morfo de *Epidendrum ibaguense* correlacionando variações morfológicas e possíveis variações do número cromossômico dos morfotipos em populações naturais.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i) Determinar a diversidade de Orchidaceae na Serra do Tepequém;
- ii) Caracterizar a ocorrência de morfotipos de *Epidendrum ibaguense* na Serra do Tepequém;
- iii) Determinar o tipo de sistema reprodutivo de *Epidendrum ibaguense*, descrever a formação de frutos entre os morfotipos e avaliar a viabilidade das sementes dos frutos;
- iv) Correlacionar variações morfológicas e possíveis variações citogenéticas.

#### 4. JUSTIFICATIVA

A perda da biodiversidade ocasionada por atividades antrópicas, por exemplo, o desmatamento e a fragmentação da vegetação tem feito com que estudos de levantamento florísticos sejam cada vez mais importantes, uma vez que estas pesquisas fornecem subsídios para a elaboração de medidas normativas que visem à proteção da biodiversidade (BECKER, 2001). Sendo a Serra do Tepequém uma área em potencial para o ecoturismo, tendo em vista que esta atividade tem crescido, é importante determinar a diversidade local. Devido às dificuldades em determinar a diversidade de Orchidaceae, este estudo pretende gerar dados que auxiliem neste sentido, principalmente para a Serra do Tepequequém, área a qual não possui levantamento florístico.

Além disso, considerando a diversidade na coloração das flores de *Epidendrum ibaguense* registrada na Serra do Tepequém, e a ausência de estudos para esta espécie, produzir informações de autoecologia em ambiente natural para *E. ibaguense* é importante, pois esta espécie pertence a um grupo taxonômico complexo, no qual a hibridização é relatada como hipótese para justificar a alta diversidade, sendo o gênero *Epidendrum* considerado um modelo potencial para estudos de questões evolutivas em espécies vegetais.

Portanto, nessa tese serão abordados esses temas, a fim de produzir dados que auxiliem em futuros estudos que abordem o cenário mais amplo sobre diversidade de Orchidaceae em Roraima e na Amazônia, considerando-se particularmente os Tepuis, assim como estudos de evolução para o gênero *Epidendrum*. Para isto, seguem os resultados obtidos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, R.; ALBACH, D.; ANSELL, S.; ARNTZEN, J. W.; BAIRD, S. J. E. et al. Hybridization and speciation. **J Evol Biol**, 26: 229-246. 2013.
- ACKERMAN, J. D.; MONTERO-OLIVER, J. C. Reproductive biology of *Oncidium variegatum*: moon phases, pollination and fruit set. **American Orchid Society Bulletin**, 54: 326–329. 1985.
- ACKERMAN, J. D. Limitations to sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). **Systematic Botany**, 14: 101-109. 1989.
- AGUILAR, R.; ASHWORTH, L.; GALLETTO, L.; AIZEN, M. A. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a metaanalysis. **Ecology Letters**, 9: 968-980. 2006.
- AGNEW, J. D. Self-compatibility/incompatibility in some orchid of the subfamily Vandoideae. **Plant Breeding**, 97: 183-186. 1986.
- ANDERSON, E.; STEBBINS, G. L. Hybridization as evolutionary stimulus. **Evolution** 8: 378- 388. 1954.
- ARAGÓN, S.; ACKERMAN, J. D. Density effects on the reproductive success and herbivory of *Malaxis massonii*. **Lindleyana**, 16: 3–12. 2001.
- ARNOLD, M. L.; BALLERINI, E. S.; BROTHERS, A. N. Hybrid fitness, adaptation and evolutionary diversification: Lessons learned from Louisiana Irises. **Heredity**, 108: 159–166. 2012.
- BAACK, E. J.; WHITNEY, K. D.; RIESEBERG, L. H. Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. **New Phytol** 167: 623–630. 2005.
- BARBOSA, R. I. Um tepui no ritmo da destruição em Roraima. **Revista Ciência Hoje**, 14 (81): 94-96, 1992.
- BARBOSA, R. I.; XAUD, M. R.; SILVA, G. N. & CATTÂNEO, A. C. Forest fires in Roraima, Brazilian Amazonia. **International Forest Fire News** 28: 51-66. 2003.

- BARBOSA, R. I.; CAMPOS, C.; PINTO, F. & FEARNSSIDE, P. M. The “Lavrados” of Roraima: Biodiversity and Conservation of Brazil’s Amazonian Savannas. **Functional Ecosystems and Communities** 1: 29-41. 2007.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M. 2012. **Orchidaceae in Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. 28 de setembro de 2017.
- BLUMENSCHNEIN, A. **Estudos sobre a Evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae)**. Tese apresentada para obtenção do título de Livre Docente da Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 54 pp. 1960.
- BORGES, S. H.; MOREIRA, M.; VICENTINI, A.; CID, C. A.; COHN-HAFT, M.; RIBAS, C.; CAPURUCHO, J. M. G.; CORNELIUS, C.; SANTOS, M. P. Muito além das florestas: Outros nichos de biodiversidade na Amazônia. **Revista Ciência Hoje**, 306 (51): 33-36. 2013.
- BORBA, E. L.; SEMIR, J.; SHEFERD, G. J. Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. **Annals of Botany**, 88: 89-99. 2001.
- BRADSHAW JR, H. D; SCHEMSKE, D. W. Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflower. **Nature** 426: 176–178. 2003.
- BRANDHAM, P. Cytogenetics. In: PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. *Genera Orchidacearum*. Vol. 1. Oxford Univ. Press. 1999.
- BRAGA, P. I. S. **Aspectos biológicos das Orchidaceae de uma campina da Amazônia Central. II – Fitogeografia das Campinas da Amazônia Brasileira**. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 345p. 1982.
- BRIEGER, F. G. **Geographic Distribution and Phylogeny of Orchids**. The Report of the Third World Orchid Conference. pp. 328-333. 1960.
- BULLOCK, S. H. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous Forest. **Biotropica** 17: 287-301. 1985.

CATLING, P. M.; CATLING, V. R. A synopsis of breeding systems and pollination in North American orchids. **Lindleyana** 6: 187-215. 1991.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; BARRETT, R. L.; FREUDENSTEIN, J. V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (eds). Orchid conservation. **Natural History Publications**: Sabah, 69-89. 2003.

CHRISTENSEN, D. E. Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. **Lindleyana**, 7: 28-33. 1992.

CHRISTENSEN, D. E. Fly pollination in the Orchidaceae. In Orchid biology: reviews and perspectives, VI. (J. Arditti, ed.). John Wiley and Sons, London, p.415-449. 1994.

van der CINGEL, N. A. Pollination of orchids by Lepidoptera: outcrossing by long distance transport. Orchid biology, reviews and perspectives, Vol. IX (ed. by K.M. Cameron, J. Arditti and T. Kull), pp. 201–259. The New York Botanical Press, New York. 2007.

COYNE, J.A.; ORR, H.A. Speciation. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 2004.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, n.4, p.299-306, 2001.

CRIBB, P. J.; CHASE, M. W. Distribution. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, eds. **Genera orchidacearum**, Vol. 3. Oxford: Oxford University Press, 3. 2005.

CRUTSINGER, G. M.; COLLINS, M. D.; FORDYCE, J. A.; GOMPERT, Z.; NICE, C. C.; SANDERS, N. J. Plant genotypic diversity predicts community structure and governs an ecosystem process. **Science**, 313: 966–968. 2006.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The Families of the Monocotyledons**. Springer Verlag. Berlin. 1985.

DARWIN, C. R. The various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects. Murray, London. 1862.

DAVIÑA, J. R.; GRABIELE, M.; CERUTTI, J. C.; HOJSGAARD, D. H.; ALMADA, R. D.; INSAURRALDE, I. S.; HONFI, A. I. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, 32: 811–821. 2009.

DEMATTEIS, M.; DAVIÑA, J. R. Chromosome studies on some orchids from South America. *Selbyana*, Sarasota 20 (2): 235-238. 1999.

DIERINGER, G. The pollination ecology of *Orchis spectabilis* L. (Orchidaceae). **Ohio Journal of Science**, 82: 218–225. 1982.

DODSON, C. H. *Oncidium pusillum* and its allies I. **American orchid society bulletin**, 26: 170 – 172. 1957.

DODSON, C. H. The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. **Bull. Am. Orchid Soc.**, 31 : 525-534, 641-649, 731-735. 1962.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. **Phytochem Bull Bot Soc Amer**, 19: 11-15. 1987.

DOYLE, J. J.; FLAGEL, L. E.; PATERSON, A. H.; RAPP, R. A.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; WENDEL, J. F. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. **Annual Review of Genetics**, 42: 443–461. 2008.

DRESSLER, R. L. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge. 1981.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge University Press, Cambridge. 1993.

DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; JORDANO, P.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G. G.; PETIT, R. J. Can population genetic structure be predicted from life-history traits? **The American Naturalist**, 169: 662-672. 2007.

EAST, E.M. The distribution of self-fertility in flowering plants. **Proceedings of the American Philosophical Society**, 82: 449–518. 1940.

ELLSTRAND, N. C.; SCHIERENBECK, K. A. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? **Proc Natl Acad Sci**, 97: 7043-7050. 2000.

ECKERT, A. J.; BOWER, A. D.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; WEGRZYN, J. L.; COOP, G.; NEALE, D. B. Back to nature: ecological genomics of loblolly pine (*Pinus taeda*, Pinaceae). **Molecular Ecology**, 19: 3789-3805. 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial – DNA restriction data. **Genetics**, 13: 479-491. 1992.

FAEGRI, K.; van der PIJL, L. **The Principles of Pollination Ecology**. Pergamon Press, Oxford. 1979.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Cytogenetic studies on species of *Habenaria* (Orchidoideae, Orchidaceae) occurring in the northeast of Brazil. **Lindleyana**, 13: 224-230. 1998.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Chromosome analysis in *Psychmorchis pusilla* (L.) Dodson and Dressler: The smallest chromosome number known in Orchidaceae. **Caryologia**, 52: 165-168. 1999.

FELIX, L.P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. **Genetics and Molecular Biology**, 23: 957-978. 2000.

FELIX L. P.; GUERRA, M. Base chromosome number of terrestrial orchids. **Plant Systematics and Evolution**, 254: 131-148. 2005.

FELIX L. P.; GUERRA, M. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). **Bot. J. Linn. Soc**, 163: 234–278. 2010.

FENSTER, C. B.; ARMBRUSTER, W. S.; WILSON, P.; DUDASH; M. R.; THOMSON, J. D. Pollination syndromes and floral specialization. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 35: 375–403. 2004.

FRANKHAM, R.; RALLS, K. Inbreeding leads to extinction. **Nature**, 392, 441–442. 1998.

FREITAS, R. C. A.; SANTOS, M. L. G.; MATIAS, L. Q. Checklist das Monocotiledôneas do Ceará, Brasil. **Revista Caatinga**, 24: 75-84. 2011.

FUNK, V. A.; HOLLOWELL, T. Introduction. In: Funk, V.A.; Hollowell, T.; Berry; Kelloff, C. & Alexander, S.N. **Checklist of the Plants of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas,**



**Bolívar, Delta Amacuro; Guiana, Suriname, Guiana Francesa).** Contributions from the United States National Herbarium, 55: 1-584. 2007.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, 120: 339–350. 2008.

GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae. **Botanical Museum Leaflets Harvard University**, 19: 57-96. 1960.

GEGEAR, R.J.; BURNS, J.G. The birds, the bees and the virtual flowers: Can pollinator behavior drive ecological speciation in flowering plants? **The American Naturalist** 170: 551-566. 2007.

GENTRY, A. H.; DODSON, C. H. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. **Annals of Missouri Garden**, 74: 205-233. 1987a.

GENTRY, A. H.; DODSON, C. H. Contribution of non-trees species richness of a tropical rain forest. **Biotropica**, 19: 149-156. 1987b.

GENTRY, A. H. Changes in plant community diversity and floristic composition on environment and geographical gradients. **Annals of the Missouri Garden**, 75: 1-34, 1988.

GOSS, G. J.; ADAMS, R. M. The reproductive biology of the epiphytic orchids in Florida V – Sexually selective attraction of moths to the floral fragrance of *Epidendrum anceps* Jacquin. **American Orchid Society Bulletin**, 45: 997-1001. 1976.

GOSS, G. J. The Reproductive Biology of the Epiphytic Orchids of Florida V – *Epidendrum difforme* Jacquin. **American Orchid Society Bulletin**, 46: 630-636. 1977.

GRIBEL, R., FERREIRA, C. A. C., COELHO, L. S., SANTOS, J. L., RAMOS, J. F. & SILVA, K. A. F. Diagnóstico Ambiental do Parque Nacional do Viruá: Relatório Temático de Botânica. ICMBio, Boa Vista. 2009.

HÁGSATER, E.; SOTO, A. M. A. **Epidendrum I**. In genera orchidacearum. Volume 4. PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N (ed). Oxford: Oxford University Press: 236–251. 2005

HAMRICK, J. L. **Isozymes and the analysis of genetic structure in plant population.** *Isozymes in plant biology*, 87-105. Dioscorides Press, Portland. 1989.

- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. **Allozyme diversity in plant species**. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*, 43-63. Sinauer, Sunderland. 1990.
- HAMRICK, J.; GODT, M. **Allozyme diversity in plant species**. In: Brown AHD, Clegg M, Kahler A, Weir B, eds. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 43–63. 1989.
- HEDRÉN, M.; NORDSTRÖM, S.; PERSSO, N.; HOVMALM, H. A.; PEDERSEN, H. A.; HANSSON, S. Patterns of polyploid evolution in Greek Marsh Orchids (*Dactylorhiza*, *Orchidaceae*) as revealed by allozymes, AFLPs and plastid DNA data. **Am J Bot**, 94:1205–1218. 2007.
- HOBALLAH, M. E.; GUBITZ, T.; STUURMAN, J.; BROGER, L.; BARONE, M.; MANDEL, T.; DELL'OLIVO, A.; ARNOLD, M.; KUHLEMEIER, C. Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. **Plant Cell**. 19:779–790. 2007.
- HODGES, S. A.; ARNOLD, M. L. Floral and ecological isolation between *Aquilegia Formosa* and *Aquilegia pubescens*. **Proc Natl Acad Sci USA** 91: 2493-2496. 1994.
- HOFFMANN, A. A.; WILLI, Y. Detecting genetic responses to environmental change. *Nat Rev Genet* 9(6): 421-432. 2008.
- HOPKINS, R.; RAUSHER, M. D. Identification of two genes causing reinforcement in the Texas wildflower *Phlox drummondii*. **Nature** 469:411–414. 2011.
- HUGHES, A. R.; STACHOWICZ, J. J. Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 101, 8998–9002. 2004.
- HUTCHINGS, M. J. **The structure of plant populations**. In: Crawley MJ (ed) *Plant Ecology*. Oxford, Blackwell Science, pp. 325-358. 1997.
- IANNOTTI, M. A.; STORT, M. N. S.; MORALES, M. A. M. O sistema reprodutivo de *Epidendrum rigidum* Jacq. (*Orchidaceae*). **Ciência e Cultura** 39: 641-644. 1987.
- IBGE, 2002. Área Territorial Oficial: Nº 5, Resolução de 10 de outubro de 2002. Diário Oficial da União 198(1): 48-65. 2002.
- ICNF - Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. Disponível em: <http://www.icnf.pt/portal>. Acesso em 03 de outubro de 2017.

JACQUEMYN, H.; BRYS, R.; HONNAY, O.; ROLDAN-RUIZ, I. Asymmetric gene introgression in two closely related *Orchis* species: evidence from morphometric and genetic analyses. **BMC Evol Biol**, 12:178. 2012,

JAIN, S. K. **Genetic reserves**. In: FRANKEL, O.H. & HAWKES, J. G. Crop genetic resources for today and tomorrow, Cambridge, Cambridge University Press p. 379-96. 1975.

JOHANSEN, B. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 103: 165-196. 1990.

KAY, K. M.; SCHEMSKE, D. W. Pollinator Assemblages and Visitation Rates for 11 Species of Neotropical *Costus* (Costaceae). **Biotropica**, 35(2): 198-207. 2003

KING, M. G.; HORNING, M. E.; ROALSON, E. H. Range persistence during the last glacial maximum: *Carex macrocephala* was not restricted to glacial refugio. **Molecular Ecology**, 18: 4256-4269. 2009.

KREBS, C.J. **Ecological methodology**. New York: Harper Collins Publishers, 1989.

LAIKRE, L.; ALLENDORF, F. W.; ARONER, L. C.; BAKER, C. S.; GREGOVICH, D. P.; HANSEN, M. M. et al. Neglect of genetic diversity in implementation of the convention on biological diversity. **Conserv. Biol.**, 24, 86–88. 2009.

LEVIN, D. A. The role of chromosomal change in plant evolution. New York: Oxford University Press. 2002.

LIMA-VERDE, L.W. **A subtribo Laeliinae Benth. (Orchidaceae) na Serra de Maranguape, Estado do Ceará, Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Orientador: Simon Joseph Mayo. 2003.

LISBOA, P.L. Estudos sobre a vegetação das campinas amazônicas II. **Acta Amazônica** 5 (3): 211-223. 1975.

LOWRY, D. B.; MODLISZEWSKI, J.; WRIGHT, K. M.; WU, C. A.; WILLIS, J. H. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. **Phil Trans R Soc B**, 363:3009–3021. 2008.

LUZ, J.; FRANCO, J. **Orquídeas de Roraima**. Embrapa, Brasília. 2012.

- MALLET, J. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends Ecol Evol**, 20:229–237. 2005.
- MALLET, J. Hybrid speciation. **Nature** 446: 279-283. 2007.
- MANEL, S.; GUGERLI, F.; THUILLER, W.; ALVAREZ, N.; LEGENDRE, P.; HOLDEREGGER, R.; GIELLY, L.; TABERLET, P. Broad-scale adaptive genetic variation in alpine plants is driven by temperature and precipitation. **Mol Ecol**. 21(15): 3729–3738. 2012.
- MEIRELLES, J. **O livro de ouro da Amazônia: mitos e verdades sobre a região mais cobiçada do planeta**. Rio de Janeiro, Ediouro. 2004.
- MICHENEAU, C.; JOHNSON, S. D.; FAY, M. F. Orchid pollination: from Darwin to the present day. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 161: 1–19. 2009.
- MILLAR, M. A.; COATES, D. J.; BYRNE M. Extensive long-distance pollen dispersal and highly outcrossed mating in historically small and disjunct populations of *Acacia woodmaniorum* (Fabaceae), a rare banded iron formation endemic. **Annals of Botany**, 114: 961–971. 2014.
- NOSIL, P.; VINES, T. H.; FUNK, D. J. Perspective: reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. **Evolution**, 59:705–719. 2005.
- OH, G.S.; Chung, M.Y.; Chung, S.G.; Chung, M.G. Contrasting breeding systems: *Liparis kumokiri* and *L. makinoama* (Orchidaceae). **Annales Zoologici Fennici**, 38: 281–284. 2001.
- PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**. Band I, Kurt Schmersow. Hildesheim. 1975.
- PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**. Band II, Kurt Schmersow. Hildesheim. 1977.
- PALMA-SILVA, C.; LEXER, C.; PAGGI, G. M.; BARBARÁ, T.; BERED, F.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. **Heredity**, 103: 503-512. 2009.

- PANSARIN, E. R. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, 26(2): 203-211. 2003.
- PANSARIN E. R.; AMARAL, M. C. E. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? **Plant Biology**, 10: 211-219. 2008a.
- PANSARIN, E. R.; AMARAL, M. C. E. Pollen and nectar as a reward in the basal epidendroid *Psilochilus modestus* (Orchidaceae: Triphoreae): a study of floral morphology, reproductive biology and pollination strategy. **Flora**, 203:474–483. 2008b.
- PARRA-TABLA, V.; VARGAS, C.L.; MAGAÑA-RUEDA, S.; NAVARRO, J. Female and male pollination success of *Oncidium ascendens* Lindley sic. (Orchidaceae) in two contrasting habitat patches: forest vs. agricultural field. **Biological Conservation**, 94: 335–340. 2000.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Mol Ecol Notes**, 6: 288-295. 2006.
- PETIT, R. J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G. G. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology**, 14: 689-701. 2005.
- van der PIJL, L.; DODSON, C. H. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables. 1966.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. **Nordic Journal of Botany**, 25: 129-136. 2007.
- PINHEIRO, F.; MACÊDO, A.; SALATINO, A. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). **Plant Syst Evol**, 283:165–177. 2009.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; MEYER, D.; FAY, M. F.; SUZUKI, R. M.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). **Mol Ecol**, 19:3981–3994. 2010.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; FAY, M. F.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid

*Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**. 2011.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 29: 467–501. 1998.

REUSCH, T. B. H.; EHLERS, A.; HAMMERLI, A.; WORM, B. Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 102: 2826–2831. 2005.

RHYMER, J. M.; SIMBERLOFF, D. Extinction by hybridization and introgression. **Annu Rev Ecol Evol Syst** 27: 83–109. 1996.

RIESEBERG, L. H.; BAACK, E. J. A genomic view of introgression and hybrid speciation. **Curr Opin Genet Dev** 17: 513-518. 2007.

RODRIGUES, M. E. F.; SOUZA, V. C.; POMPÊO, M. L. M. Levantamento florístico de plantas aquáticas e palustres na represa Guarapiranga, São Paulo, Brasil. **Bol. Bot. Univ. São Paulo, São Paulo**, v. 35, p. 1-64, 2017.

SACCHERI, I.; KUUSSAARI, M.; KANKARE, M.; VIKMAN, P.; FORTELIUS, W.; HANSKI, I. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. **Nature**, 392, 491–494. 1998.

SCOPECE, G.; MUSACCHIO, A.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. Patterns of reproduction isolation in Mediterranean deceptive orchids. **Evolution**, 61:2623-2642. 2007.

SCOPECE, G.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. Evolution of postzygotic reproductive isolation in a guild of deceptive orchids. **Am Nat**, 171:315–326. 2008.

SEEHAUSEN, O. Hybridization and adaptive radiation. **Trends Ecol Evol** 19: 198-207. 2004.

SILVA, M. F. F.; SILVA, J. B. F. **Orquídeas Nativas da Amazônia Brasileira II**. Belém: UFRA. 2004.

SHUTTLEWORTH, F. S.; ZIM, H. S.; DILLON, G.W. **Orquídeas**. Portugal: Bertrad, 1970.

SOUZA, V.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática*. 2. Ed. 640p. 2008.

STORT, M. N. S.; MARTINS, P. S. Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). **Ciência e Cultura**, 32: 1080-1084. 1980.

STREISFELD, M. A.; RAUSHER, M. D. Altered trans-regulatory control of gene expression in multiple anthocyanin genes contributes to adaptive flower color evolution in *Mimulus aurantiacus*. **Mol Biol Evol** 26: 433-444. 2009

TABERLET, P.; ZIMMERMANN, N. E.; ENGLISCH, T. et al. Genetic diversity in widespread species is not congruent with species richness in alpine plant communities. **Ecology Letters**, 15: 1439–1448. 2012.

THOMSON, J.D.; WILSON, P. Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence, and directionality. **International Journal of Plant Sciences** 169: 23–38. 2008.

TOSCANO DE BRITO, A. L. V.; CRIBB, P. **Orquídeas da Chapada Diamantina**. São Paulo: Ed. Nova Fronteira, 400p. 2005.

TREMBLAY, R. L. Frequency and consequences of multi-parental pollinators of *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* (Orchidaceae). **Lindleyana**, 9: 161-167. 1994.

TREMBLAY, R. L.; ACKERMAN, J. D.; ZIMMERMAN, J.K.; CALVO, R. N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, 84: 1-54. 2005.

VANZOLINI, P. E.; CARVALHO, C. M. Two sibling and sympatric species of *Gymnophthalmus* in Roraima, Brasil (Sauria, Teiidae). **Papéis Avulsos de Zoologia** 37: 173-226. 1991.

VEROLA C. F. Estudos biosistemáticos em espécies de *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae: Laeliinae) ocorrentes em complexos rupestres de altitude. PhD Thesis. State University of Campinas. Leader: João Semir. 2008.

VIREIRA, T. L.; BARROS, F.; ROQUE, N. Orchidaceae no Município de Jacobina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea** 41(3): 469-482, 2014.

WENDT, T.; CANELA, M. B. F.; KLEIN, D. E.; RIOS, R. I. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **Plant Syst Evol** 232: 201–212. 2002.

WHIGHAM, D.F.; O'NEILL, J. **Population ecology of terrestrial orchids**. The dynamics of flowering and fruit production in two eastern North American terrestrial orchids, *Tipularia discolor* and *Liparis lilifolia*. Eds. Wells, T. C. E.; Willems, J. H. The Hague, SPB Academic Publishing, 89–101pp. 1991.

WITHNER, C. L. **The Orchids**. A scientific survey. New York, Ronald Press Comp. 648p. 1959.

WOLFE, A. D. ISSR protocols. 2000. Disponível em: <http://www.biosci.ohiostate.edu/~awolfe/ISSR/protocols.ISSR.html>. Acessado em: setembro de 2012.

XU, S.; SCHLÜTER, P. M.; SCOPECE, G.; BREITKOPF, H.; GROSS, K.; COZZOLINO, S.; SCHIESTL, F. P. Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids. **Evolution**, 65:2606–2620. 2012.

YAMAGISHI-COSTA, H.; FORNI-MARTINS, E. R. Hybridization and polyploidy: cytogenetic indications of *Hoffmannsenggella* (Orchidaceae) species evolution. **International Journal of Botany**, 5: 93–99. 2009.

YUAN, Y. W.; SAGAWA, J. M.; YOUNG, R. C.; CHRISTENSEN, B. J.; BRADSHAW, H. D. Genetic dissection of a major anthocyanin QTL contributing to pollinator-mediated reproductive isolation between sister species of *Mimulus*. **Genetics** 194:255–263. 2013.

ZAMBRANO, A.Y; DEMEY, J.R; MARTÍNEZ, G.; FUENMAYOR, F.; GUTIÉRREZ, Z.; SALDAÑA, G.; TORREABLA, M. Método rápido, económico y confiable de, mini preparación de adn para amplificaciones por rapd en bancos de germoplasma. **Agronomía Tropical** 52(2): 235-243, 2002.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4<sup>th</sup> edt. London: Prentice-Hall. 1999.

ZOTZ, G.; ANDRADE, J.L. La ecología y la fisiología de las epifitas y las hemiepifitas. In: Guariguata M, Catan, G (ed) **Ecología y conservación de bosques neotropicales**, San José, Editorial Libro Universitario Regional, pp. 271-296. 2002.



## Capítulo 1 - Orchid's Diversity at Tepequém's Tepuy, Roraima, Brazil

Sanna Rocha Nóbrega, Francisco Joaci de Freitas Luz, Jane Maria Franco de Oliveira, Wellington Farias Araújo, Silvio Garcia Tomé

Ornamental Horticulture v. 22, No. 3, 2016, p. 265-271

Received in 18/08/2016 and accepted in 11/10/2016

**Abstract:** The Orchidaceae family is one of the largest among the angiosperm, with more than 25000 species. About 2500 species occur in Brazil, 871 species are found in the Brazilian Amazon. In the far north of Brazil, in the state of Roraima, is located the Tepequém Mountains, a *Tepuy* - mountain top with table shape – with relictual vegetation due to prolonged isolation. Historically, Tepequém was a site of diamond exploration, which caused changes in the landscape. However, with mining decay, ecotourism became the main economic activity. About 68% of Roraima's territory is composed of conservation areas and indigenous lands, and the Tepequém Mountain is the only *Tepuy* found outside the protected areas. Thus, this study aims to describe the orchid flora found at Tepequém's *Tepuy*, an area of ecological and economical importance for Roraima's ecotourism. The survey was carried out through expeditions between the years of 2013-2015. The species were photographed, harvested and taken to Embrapa Roraima for identification, exsiccate confection and/or cultivation. The exsiccatae were deposited at Roraima's Integrated Museum (Museu Integrado de Roraima – MIRR) and the Federal University of Roraima (Universidade Federal de Roraima – UFRR). Any orchid specie deposited by other collectors was also considered. Thus, 20 genera and 34 species were registered at Tepequém. The genera with largest representation were the *Epidendrum* (7 spp.), *Scaphyglottis* (4 spp.) and *Habenaria* (3 spp.), with 70% of the other genera presenting one specie only. 10% of Roraima's orchid's diversity is found at Tepequém. The diversity of habitats – forest, campina and savannah – found at Tepequém's *Tepuy* allows the Orchidaceae species diversity and the unique flora with low similarities to other floristic surveys.

**Key-words:** Orchidaceae, High altitude vegetation, Amaraji, Amazon

**Resumo:** A família Orchidaceae é uma das maiores dentre as angiospermas com mais de 25.000 espécies. No Brasil existem cerca de 2.500 espécies, sendo que 871 espécies são encontradas na Amazônia brasileira. No extremo norte do Brasil, no estado de Roraima,

encontra-se a serra do Tepequém, um *Tepuy*, ou seja, uma montanha com o topo em forma de mesa, onde a vegetação é relictual devido ao isolamento prolongado. O Tepequém historicamente foi alvo da exploração de diamante, o que causou mudanças na paisagem; porém, com a decadência da mineração, atualmente a principal atividade econômica desenvolvida é o ecoturismo. Em Roraima cerca de 68% do território são áreas de conservação e terras indígenas, e a serra do Tepequém é o único Tepuy que não se encontra dentro de áreas de proteção. Portanto, o objetivo deste estudo é descrever a flora orquidófila no *Tepuy* do Tepequém, uma área de importância ecológica e econômica em termos de ecoturismo no estado de Roraima, Brasil. O levantamento das espécies de Orchidaceae foi realizado a partir de expedições entre os anos de 2013 e 2015. As espécies foram fotografadas, coletadas e levadas a sede da Embrapa Roraima para identificação, confecção de exsiccatas e/ou cultivo. As exsiccatas foram depositadas nos herbários do Museu Integrado de Roraima (MIRR) e da Universidade Federal de Roraima (UFRR), as espécies de orquídeas depositadas por outros coletores nos herbários também foram consideradas. Assim, foram registrados 20 gêneros e 34 espécies de Orchidaceae no Tepequém. Os gêneros com maior representatividade foram *Epidendrum* (7 spp.), *Scaphyglottis* (4 spp.) e *Habenaria* (3 spp.), enquanto 70% dos gêneros apresentaram apenas uma espécie. No Tepequém concentra-se 10% da diversidade de orquídeas de Roraima. Esta diversidade de habitats – floresta, campina e savana, encontrados no *Tepuy* do Tepequém possibilita a diversidade de espécies de Orchidaceae e a flora singular que apresentou pouca similaridade com outros levantamentos florísticos.

Palavras-chave: Orchidaceae, Vegetação de altitude, Amajari, Amazônia.

## Introduction

The Orchidaceae family is one of the largest among the angiosperm, with more than 25000 species (CHASE et al., 2003). A privileged orchid flora can be found in Brazil, with yearly reports of new species been published in understudied places. Thus, floristic surveys covering this family are important to enlarge the available knowledge on orchid's diversity.

The Guiana Highlands can be found in northern South America, an area comprised by Brazil, Venezuela and Guyana, in which a great number of table-shaped mountains, regionally called "*Tepuy*", can be found. A few are located at Roraima, such as: the Roraima Mount (RR), the Tepequém Mountains (RR), Urutanim (RR), Uafaranda (RR) and Surucucus (RR). These areas remained isolated for a long time, resulting in a unique floristic unit (ALVES et al., 2007). With this in mind, Haffer (1992) pointed that studies were necessary to understand how this unique landscape came to be at the Amazon portion.

Throughout the 30-70 decades, the Tepequém was a site of diamond mining (BARROS, 1995). Due to dynamite usage several environmental changes occurred during this time, such as riverbed alterations and watercourse's silting (HOLANDA, 2014). Nowadays, after mining prohibition, tourism became the main economic activity, showing the region's natural beauty and its unique natural resources. Interestingly, few studies were conducted in the area, and the floral surveys necessary for both tourism activities and environmental preservation remain to be done.

Studies carried out by Alves et al. (2007) point that soil drainage and poverty of nutrients, common features between the *Tepuy* and rupestrian fields, probably contributed to species' distribution pattern and similarity occurrence between these two landscapes. The authors reported great species' diversity for the Xyridaceae and Eriocaulaceae families at the *Tepuy* and rupestrian fields. On the other hand, the Rapateaceae family encompasses more than 100 species in the *Tepuy*, but is represented by the single endemic specie *Cephalostemon riedelianus* Koern in the rupestrian fields (ALVES et al., 2007). However, this study did not include the monocotyledons. Thus, the Orchidaceae family was not compared. In order to contribute to the floristic inventory of the Amazon, especially regarding its mountainous areas, this study aimed to describe the Orchidaceae species found in Tepequém's *Tepuy*, an area with distinctive vegetation, of high ecological and economical importance for the Amazon region.

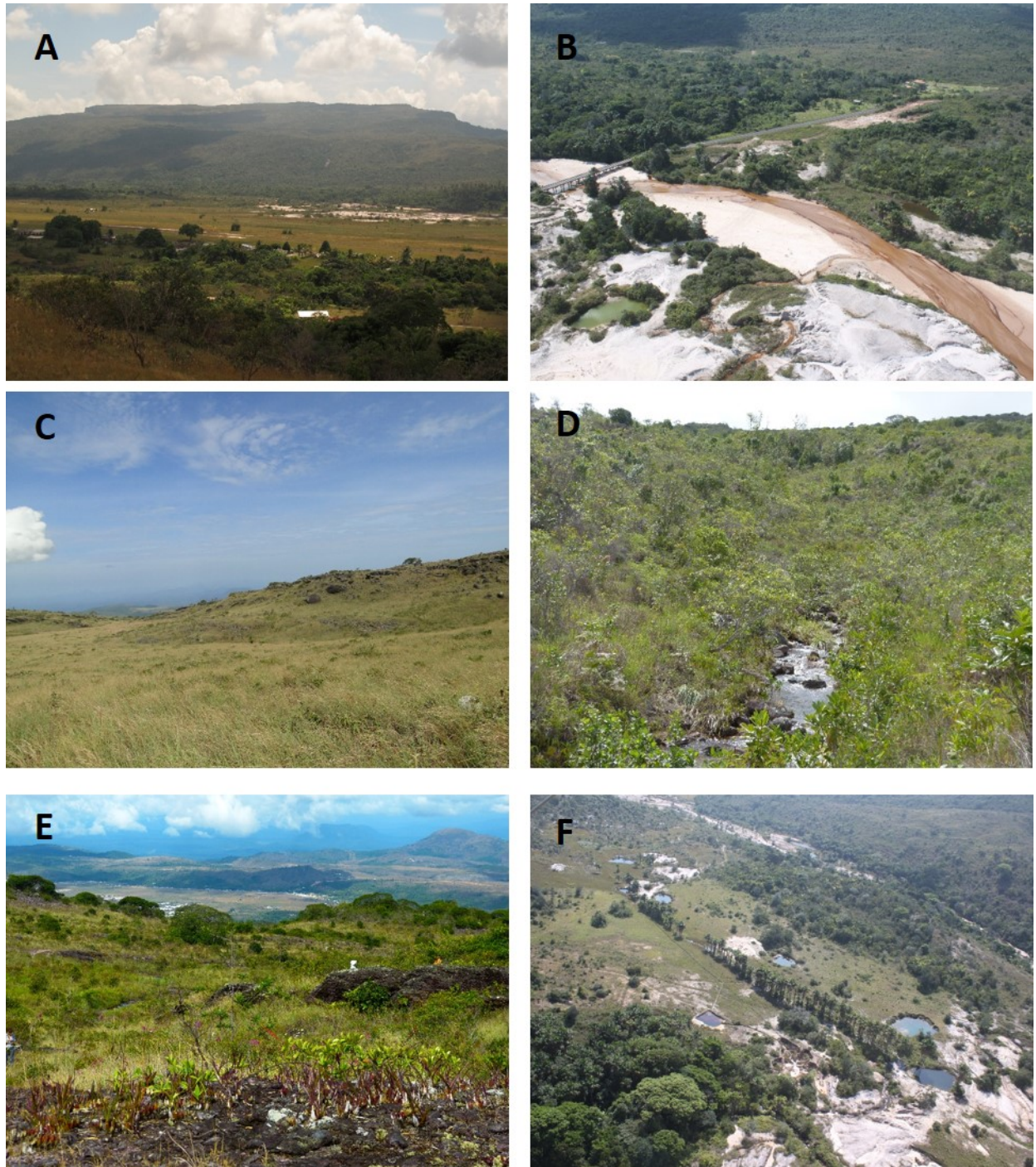
## Material and methods

### *Study site*

The Tepequém Mountain is located in a border area of Roraima, between Brazil and Venezuela, 50 km away from the municipality of Amajari. The mountain covers an area of 12000 Km<sup>2</sup>, located in the center of a closed basin. The altitude ranges from 550 to 1100 m, with humid tropical climate type Am (Köppen classification) and annual average temperatures between 22 and 24° C. During the rainy season, temperature below 20° C have been registered for the areas above 700 meters and at the mountain peak, with annual average rainfall of 2250 mm (BRASIL, 1975).

The vegetation that comprises study site is made of a dense forest area, with arboreal species such as *Micranda lopessi*, R. E. Schultes., *Nectandra (Ocotrea) rubra* Mez., *Elizabetha* sp., *Eschweilera odora* Miers., *Cariniana micrantha*, *Mezilaurus itauba*, among others (VELOSO et al., 1975). Whereas, according to Silva (1997), the open and campestre vegetation is characterized as a steppe savanna composed mainly by poaceae and cyperaceae, in special species as: *Brachiaria mutica* Stapf, *Panicum maximum* Jacq., *Cynodon dactylon* L.

Pers. and some compositae (Fig. 1.1). According to Veloso et al. (1975), been composed by an autochthonous flora makes this vegetation an ecological refuge. A riparian vegetation can be found in areas near drainages, with the formation of small alleys buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) (Fig. 1.1-F).



**Figure 1.1.** Landscapes that form the Tepequém. A - Tepequém Mountain Plateau; B - Forest on the banks of Igarapé do Paiva; C - Steppe savannah; D - Savannah near the watercourse of a semi-perennial water; E - Rocky outcroppings; and F- Buritis' Vereda and artificial lakes resulting from the mining activity.

The Orchidaceae species' survey was carried out through expeditions between the years of 2013-2015, covering both the dry and rainy seasons. The species were photographed, harvested and taken to Embrapa Roraima headquarters for identification, exsiccate confection and/or cultivation. Specimen's identification was performed based on specialized bibliography (COGNIAUX, 1893-1896; 1898-1902; 1904-1906; MIRANDA, 1996; LUZ e FRANCO, 2012). The exsiccatae were deposited at Roraima's Integrated Museum (Museu Integrado de Roraima – MIRR) and at the Federal University of Roraima (Universidade Federal de Roraima – UFRR). Orchid species deposited by other collectors were also considered. Sorensen similarity index (SI) was calculated using the following formula:  $SI = 2a/2a+b+c$ , in which a represents the number of species in common, b and c represent the number of exclusive species in each area (MUELLER-DUMBOIS e ELLENBERG, 1974).

## Results

Orchidaceae species from 20 genera and 34 were found (Figure 1.2). The genera with largest representation were the *Epidendrum* (7 spp.), *Habenaria* (4 spp.) and *Scaphyglottis* (4 spp.), with 70% of the other genera presenting one specie only. Forty-seven percent of the species found at Tepequém have a wide geographical distribution, even been found in other countries, been well disseminated in Brazil. Of the 34 species, 12 occur only in Brazil's north region, with no reports of five o them been found in any other federation state - *Encyclia auyantepuensis* Carnevali & I.Ramírez, *Epistephium hernandii* Garay, *Koellensteinia kellnereana* Rehb.f., *Mapinguari auyantepuensis* (Foldats) Carnevali & R.B.Singer and *Scaphyglottis bidentata* (Lindl.) Dressler. Among them, *Scaphyglottis sickii* Pabst is endemic to Brazil, been widely distributed in the whole country (FLORA DO BRASIL 2020, 2016).

A species distribution in four main physiognomies was observed: forest – with eight species of epiphytic habit; campina – 17 species with variable habit among rupicolous or terrestrial; savannah – four species of terrestrial habit; and rocky hillside – five species of exclusive rupicolous habit (Tab. 1.1).





Figure 1.2. Orchidaceae species found at Tepequém Mountain, Roraima.

**Table 1.1.** List of Orchidaceae species found at Tepequém Mountain, Roraima, predominant habit and vegetation in which the species were found.

<b>Espécie</b>	<b>Habitat</b>	<b>Vegetação</b>
<i>Bulbophyllum exaltatum</i> Lindl.	Rupicolous	Rocky hillside
<i>B. manarae</i> Foldats	Epiphyte	Forest
<i>Catasetum discolor</i> (Lindl.) Lindl.	Rupicolous	Campina
<i>C. planiceps</i> Lindl.	Rupicolous	Campina
<i>Cleistes rosea</i> Lindl.	Terrestrial	Savanna
<i>Cyrtopodium andersonii</i> (Lamb. ex Andrews) R.br.	Rupicolous	Campina
<i>Encyclia auyantepuiensis</i> Carnevali & I.Ramírez	Rupicolous	Campina
<i>Epidendrum carpophorum</i> Barb. Rodr.	Epiphyte	Forest
<i>E. ibaguense</i> Kunt.	Rupicolous	Campina
<i>E. micronoctrurnum</i> Carnevali & G.A.Romero	Epiphyte	Forest
<i>E. nocturnum</i> Jacq.	Terrestrial	Campina
<i>E. orchidiflorum</i> (Salzm.) Lindl.	Terrestrial	Campina
<i>E. ramosum</i> Jacq.	Epiphyte	Campina
<i>E. strobiliferum</i> Rchb.f.	Epiphyte	Forest
<i>Epistephium duckei</i> Huber	Terrestrial	Campina
<i>E. hernandii</i> Garay	Terrestrial	Campina
<i>Habenaria mitomorpha</i> aff. Kraenzl.	Terrestrial	Savanna
<i>H. obtusa</i> Lindl.	Terrestrial	Campina
<i>H. seticauda</i> Lindl. Ex Benth.	Terrestrial	Campina
<i>Habenaria</i> sp.	Terrestrial	Campina
<i>Jacquiiniella globosa</i> (Jacq.) Schltr.	Rupicolous	Rocky hillside

<i>Koellensteinia kellnereana</i> Rchb.f.	Terrestrial	Savanna
<i>Mapinguari auyantepuensis</i> (Foldats) Carnevali & R.B.Singer	Rupicolous	Campina
<i>Nohawilliamsia pirarensis</i> (Richb.f.) M.W.Chase & Whitten ex. M.W.Chase & Whitten	Rupicolous	Campina
<i>Notilia</i> sp.	Epiphyte	Forest
<i>Oeceoclades maculata</i> (Lindl.) Lindl.	Terrestrial	Forest
<i>Polystachya concreta</i> (Jacq.) Garay & Sweet	Epiphyte	Mata
<i>Prostechea vespa</i> (Vell.) W.E.Higgins.	Terrestrial	Campina
<i>Sacoila</i> sp.	Terrestrial	Savanna
<i>Scaphyglottis bidentata</i> (Lindl.) Dressler	Rupicolous/ Epiphyte	Rocky hillside/ Campina
<i>S. sickii</i> Pabst	Epiphyte	Forest
<i>S. stellata</i> Lodd. ex Lindl.	Epiphyte	Campina
<i>Scaphyglottis</i> sp.	Rupicolous	Rocky hillside
<i>Sobralia granitica</i> G.A.Romero & Carnevali	Terrestrial	Campina
<i>Trigonidium acuminatum</i> Batem. ex Lindl.	Rupicolous	Rocky hillside

The Orchidaceae species registered at Tepequém Mountain were compared to the flora found at Chapada Diamantina, Bahia (BA), at Caxiauanã National Forest, Pará (PA), and at Viruá National Park, Roraima (RR) using Sorensen similarity index. Results showed similarities of 5%, 4.6% and 20% between communities, respectively. This indicates that Tepequém's *Tepuy* orchidophilic flora has greater similarity to Viruá's, with only 20% of similar species.



## Discussion

Silva et al. (1995) registered the occurrence of 378 species in an inventory regarding the Amazon orchids, in which 18 occur at the Tepequém Mountain. However, by the time in which the study was conducted, the occurrence of two species had not been recorded at Roraima: *Cyrtopodium andersonii* (Lamb. ex Andrews) R.br. and *Cleistes rosea* Lindl. After two decades, the number of Orchidaceae species found at Brazilian Amazon increased more than twofold, for a total of 871 species (FLORA DO BRASIL 2020, 2016), in which all 34 species found at Tepequém Mountain are included.

There are records of 309 species distributed in 110 genera at Roraima, in which nine are endemic to the state and 26 are endemic to Brazil (FLORA DO BRASIL 2020, 2016). This great variety of orchids' species results from the diversity in vegetation and terrain found in the state. This way, Roraima is considered the third state in diversity of the Brazilian Amazon, with 10% of the orchids' variety occurring at Tepequém mountaintop (FLORA DO BRASIL 2020, 2016).

According to Conceição and Pinari (2007), the common characteristics between the *Tepuy* and the rupestrian fields result in similar distribution patterns for the Xyridaceae and Eriocaulaceae families, which could indicate a high level of similarity among the Orchidaceae in both phytophysionomies. However, when species found at Tepequém were compared to those found at Chapada Diamantina (Bahia), only two were found in both areas, *Epidendrum ramosum* Jacq. and *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl.

On the other hand, when compared to the floristic survey carried out by Bastos and Berg (2012) at Morro do Chapéu (Chapada Diamantina micro-region), four species were found in common: *Bulbophyllum exaltatum* Lindl., *B. manarae* Foldats, *Epidendrum orchidiflorum* (Salzm.) Lindl. and *O. maculata*, for a total of 5 common species between the Tepequém Mountain and Chapada Diamantina.

Considering the lack of floral surveys regarding Roraima's *Tepuy* orchidophilic flora, it is only possible to compare the Tepequém Mountain and the Viruá National Park (Parque Nacional do Viruá), in which 65 orchid species were registered (PESSOA, 2013), 10 occurring in both areas, been mainly found in *campina* areas. They are: *Catasetum discolor* (Lindl.) Lindl., *C. rosea*, *E. carpophorum*, *E. nocturnum* Jacq., *E. orchidiflorum*, *E. strobiliferum* Rchb.f., *Nohawilliamsia pirarensis* (Richb.f.) M.W.Chase & Whitten ex. M.W.Chase & Whitten, *Prostechea vespa* (Vell.) W.E.Higgins., *Scaphyglottis sickii* Pabst and *Trigonidium acuminatum* Batem. ex Lindl.

Three species can be found at both Tepequém and the National Forest of Caxiuanã (Floresta Nacional de Caxiuanã – Pará), based on a floral survey performed by Kock et al. (2014) encompassing holoepiphytes and hemiepiphytes Orchidaceae. They are: *Encyclia auyantepuiensis* Carnevali & I.Ramírez, *E. carpophorum* Barb. Rodr. and *E. nocturnum* Jacq. This way, 11 species found at Tepequém were compared in Pessoa et al. (2014) study, been included at the Guyana Endemism Center Centro de Endemismo da Guiana).

Comparisons between the floral surveys resulted in low species similarity when areas were compared (SI= 0.2 – between Viruá and Tepequém), probably due the prolonged floral isolation in the *Tepuy*. The lack of floral surveys including monocotyledons in these environments impairs more specific comparisons, which in turn could point the ecological relationships that result in the local flora.

## **Conclusion**

The habitats diversity (forest, *campina* and savannah) found at the Tepequém's mountaintop is related to the Orchidaceae diversity found in the area.

The Tepequém's *Tepuy* showed no similar flora when compared to the floral surveys carried out at the rupestrian fields, nor to the Chapada Diamantina or even the National Park of Viruá.

The orchids flora found at Tepequém's Mountain confirms that the *Tepuys* have autochthonous vegetation.

## Bibliography

ALVES, R.J.V.; CARDIN, L.; KROPF, M. S. Angiospermdisjunction “Camposrupestres - restingas”: a re-evaluation. **Acta Botanica Brasilica**, v.21, n.3, p.675-685, 2007.

BARROS, N. C. C. **Roraima paisagens e tempo da Amazônia Setentrional**. Recife: UFPE. 1995.142 p.

BASTOS, C.A.; VAN DER BERG, C. A família Orchidaceae no município de Morro do Chapéu, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v.63, n.4, p.883-927, 2012.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. Projeto Radam. Folha NA-20 Boa Vista e parte das folhas NA-21 Tumucumaque, NB-20 Roraima e NB-21: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro: DNPM, 1975. 428 p.

CHASE, M.W.; CAMERON, K.M.; BARRETT, R.L.; FREUDENSTEIN, J.V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (eds). Orchid conservation. **Natural History Publications**: Sabah, p.69-89. 2003.

COGNIAUX, A. Orchidaceae. In: C.F.P. Martius, A.G. Eichler & I. Urban (eds.). **Flora brasiliensis**, v.3, n.4. pp.1-672. 1893-1896.

COGNIAUX, A. Orchidaceae. In: C.F.P. Martius, A.G. Eichler & I. Urban (eds.). **Flora brasiliensis**, v.3, n.5. pp.1-664. 1898-1902.

COGNIAUX, A. Orchidaceae. In: C.F.P. Martius; A.G. Eichler & I. Urban (eds.). **Flora brasiliensis**, v.3, n.6. pp.1-604. 1904-1906.

CONCEIÇÃO, A.A.; PIRANI, J.R. Diversidade Em Quatro Áreas De Campos Rupestres Na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: Espécies Distintas, Mas Riquezas Similares. **Rodriguésia**, v.58, n.1, p.193-206, 2007.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. **Orchidaceae**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 21 Jul. 2016.

HAFFER, J. Ciclos de tempo e indicadores de tempo na história da Amazônia. **Estudos Avançados USP**, v.6, n.15, p.7-40. 1992.

LUZ, J.; FRANCO, J. **Orquídeas de Roraima**. Brasília: Embrapa. 2012. 184p.

MIRANDA, F.E.L.F. **Orquídeas da Amazônia brasileira**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1996. 191p.

MUELLER-DUMBOIS, D.; ELLENBERG, H. Aims and methods of vegetation ecology. New York, John Wiley & Sons, p.574.1974.

PESSOA, E.M. 2013. Orchidaceae No Parque Nacional Do Viruá, RR, Brasil: Aspectos Taxonômicos e Biogeográficos. Tese de mestrado.

PESSOA, E.M.; SILVA, I.A.A.; ALVES, M. Aspects of Orchidaceae distribution in Costa Rica and northwestern South America: a study on similarity with emphasis on the Amazonian Region. **Hoehnea**, v.41, n.4, p.623-630, 2014.

SILVA, E. L. S. A vegetação de Roraima. In: BARBOSA, R. I.; FERREIRA, E. J. G.; CASTELLÓN, E. G. (Ed.) **Homem, ambiente e ecologia no estado de Roraima**. Manaus: INPA. p.400-415. 1997.

VELOSO, H. P. et al. Vegetação da folha NA.20 Boa Vista In: BRASIL. Departamento Nacional da Produção Mineral. Projeto Radam. **Folha NA-20 Boa Vista e parte das folhas NA-21 Tumucumaque, NB-20 Roraima e NB-21**: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro: DNP. 1975

## Capítulo 2- Estudo da Biologia Floral e Sistema Reprodutivo de *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil

**Resumo:** O gênero neotropical *Epidendrum* L. é um dos maiores da família Orchidaceae e no Brasil ocorrem 137 espécies, nas quais há relatos de plantas com morfologia floral intermediária. Na serra do Tepequém, em Roraima, existem registros da ocorrência de variações na coloração das flores de *E. ibaguense*. Portanto, o objetivo deste estudo é identificar e caracterizar a ocorrência de variações morfológicas e fenotípicas, assim como o sistema reprodutivo e determinar a viabilidade das sementes nesta espécie. Para caracterização fenotípica foram marcados 41 indivíduos observados no período de mar/2013 a fev/2015. O sistema reprodutivo foi avaliado a partir de tratamentos de autopolinização e polinização cruzada, e os frutos resultantes destes testes foram coletados e conservados em FAA 50%. Posteriormente, foi analisada a viabilidade das sementes com auxílio de microscópio óptico. O período de floração de *E. ibaguense* ocorreu entre os meses de novembro e fevereiro, sendo o pico de floração em dezembro. Embora os morfotipos apresentem sincronia na floração ocorrem variações nas características morfológicas, principalmente entre os morfotipos semialba e vermelho. Os testes de sistema reprodutivo resultaram em taxas de formação de frutos por autopolinização de 68% e de polinização cruzada de 30%. A viabilidade das sementes dos frutos de polinização cruzada foi de 80% e dos frutos de autopolinização foi de 69%, resultando em um índice de auto-incompatibilidade (IAI) de 86,6%, indicando que *E. ibaguense* é autocompatível.

**Palavras-chave:** Diversidade floral, morfologia, autocompatibilidade.

**Abstract:** The *Epidendrum* L. neotropical genus is one of the largest in the Orchidaceae family, with 137 species in Brazil. Variations in the *E. ibaguense* flower color have been reported at Tepequém's Mountain, Roraima. Thus, this study aimed to identify and characterize the morphological and phenotypic variations occurrences, as well as the variations in the reproductive system, and assess the viability of the species' seeds. For the phenotypic characterization, 41 subjects were marked and observed from mar/2013 to fev/2015. The reproductive system was assessed using self-pollination and cross-pollination treatments, and the resulting fruits were collected and preserved in FAA 50%. Afterwards, the seeds viability was analyzed with an optical microscope. The *E. ibaguense* flowering period

occurred between November and February, peaking in December. Despite the morphotypes showing flowering synchrony, variations in the morphological characteristics were found, especially between the semialba and red morphotypes. The reproductive system tests resulted in fruit formation rates of 68% for self-pollination and 30% for cross-pollination, with seeds viability of 69% and 80%, respectively. A self-incompatibility index (S-index) of 86.6% was found, indicating that *E. ibaguense* is selfcompatible.

**Key-words:** Floral diversity, morphology, selfcompatibility, seeds viability, *Tepuy*.

## INTRODUÇÃO

*Epidendrum* L. constitui um dos gêneros com maior número de representantes da família Orchidaceae com 1.125 espécies identificadas atualmente (Chase et al., 2003). No Brasil, segundo Govaerts et al. (2017), 159 espécies de *Epidendrum* foram reconhecidas na World Checklist. Entretanto, encontram-se registradas apenas 139 espécies deste gênero, segundo a Flora do Brasil 2020 (2017), das quais 83 espécies são endêmicas. Essa diferença no número de espécies descritas decorre, principalmente, devido à sinonímia adotada por diferentes autores (Nicoletti et al., 2015). Localizado no extremo norte do Brasil, na região amazônica, o Estado de Roraima apresenta alta diversidade de Orchidaceae, com 312 espécies em 111 gêneros, das quais 30 espécies pertencem ao gênero *Epidendrum* (Flora do Brasil 2020, 2017).

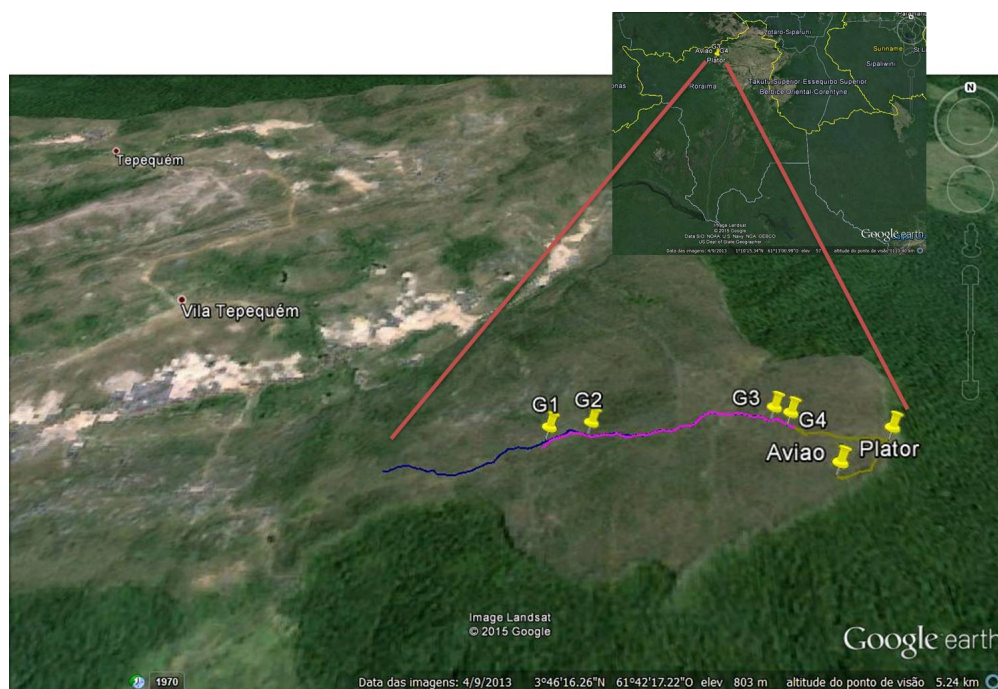
No gênero *Epidendrum* é relativamente comum a ocorrência de plantas com morfologia floral intermediária, principalmente como resultado de hibridização. Segundo Hubbs (1955), híbridos interespecíficos são indivíduos com fenótipo intermediário entre suas espécies parentais. Na literatura, estudos que focam a hibridização para o gênero são mais frequentes do que investigações de variações intraespecíficas na morfologia floral de plantas com fenótipo intermediário (Pinheiro, Cozzolino, 2013). Além disso, a variação da cor da flor dentro das espécies de angiospermas é incomum. A maioria dos casos relatados de polimorfismos de cor da flor envolve um pequeno intervalo de cores e podem simplesmente representar plasticidade fenotípica ou equilíbrio entre mutação e seleção (Kay, 1978, Waser, Price, 1981). Sendo assim, a alta diversidade e a ocorrência de híbridos reprodutivamente viáveis faz com que *Epidendrum* seja considerado um modelo potencial para o estudo de questões evolutivas em espécies vegetais (Pinheiro, Cozzolino, 2013).

Assim, baseado no conjunto destas considerações, e sabendo-se que na Serra do Tepequém, em Roraima, existem registros com ocorrência de variações na coloração das flores de indivíduos de *E. ibaguense* (Luz, Franco, 2012), este estudo objetivou identificar e caracterizar as variações morfológicas e fenotípicas, bem como o sistema reprodutivo intraespecífico em *E. ibaguense* e determinar a viabilidade das sementes desta espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Área de estudo* – O trabalho foi realizado na Serra do Tepequém, município de Amajari, localizado na região noroeste do Estado de Roraima. A altitude dos picos da Serra variam entre 600 e 1.100m. O clima é tropical úmido, do tipo Am (Köppen, 1948), e as temperaturas médias anuais variam entre 22 e 24°C. Porém, no período chuvoso, entre os meses de abril a setembro, nas áreas do topo da serra, de altitudes elevadas, são registradas temperaturas inferiores a 20°C. A precipitação média anual é de 2000mm (Barbosa, 1997). A cobertura vegetal é formada por Floresta Ombrófila e Savana Estépica (Veloso et al., 1975, Silva, 1997). Essa região é considerada um santuário ecológico de orquídeas e bromélias, que durante diferentes épocas do ano apresentam intensa floração nas encostas da serra (Luz, Franco, 2012).

*Atividade de campo* – Em uma trilha preexistente, conhecida como trilha para o Plator, foram observados agrupamentos (subpopulações) de *E. ibaguense*. Os primeiros indivíduos desta espécie foram encontrados a 830 m de altitude (G1), continuando a trilha foram marcados mais três grupos (G2, G3 e G4) (fig 2.1). O maior agrupamento de *E. ibaguense* foi o G4 (03°45'54,6" N, 61°41'17,5" O, 1.040 m). No qual, através de contagem direta foram estimados aproximadamente 300 indivíduos, destes 41 indivíduos foram marcados com placas de PVC numeradas para caracterização fenotípica. Durante o período de floração determinou-se que os indivíduos amostrados foram 38 magenta, dois rósea e um semialba, os quais entre março/2013 e fevereiro/2015 foram observados mensalmente em expedições ao campo.

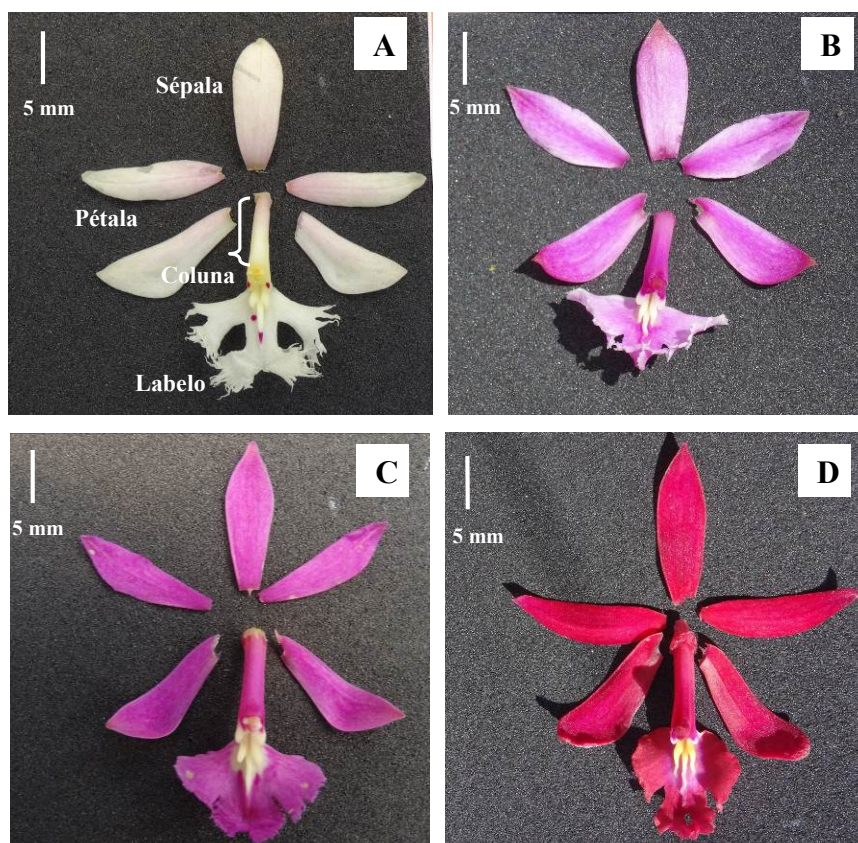


**Figura 2.1.** Distribuição dos agrupamentos de indivíduos de *Epidendrum ibaguense* ao longo da trilha para o Plator na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil.

Foram determinados quatro morfotipos a partir da variação de coloração das flores (Fig. 2.2). Para avaliar as variações morfológicas entre os morfotipos foram analisadas, em campo e com auxílio de paquímetro digital, características vegetativas e florais. Sendo observado o comprimento e espessura da folha (medida retirada da segunda folha da haste de cima para baixo), comprimento da haste, comprimento das sépalas e pétalas, e, da coluna, comprimento e diâmetro do labelo, em 10 flores de cada morfotipo. Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo pesquisador.

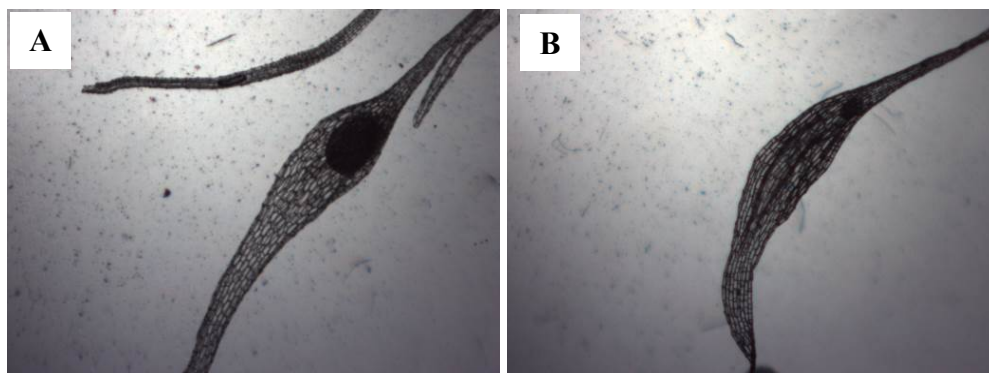
Foram realizados tratamentos manuais experimentais de autopolinização (N=36), polinização cruzada (N=34) e polinização cruzada entre diferentes morfotipos (N=2). Os cruzamentos foram realizados em flores jovens com polínias intactas, evitando a utilização de mais de duas flores por inflorescência. A transferência da polínia foi realizada com auxílio de uma haste de madeira, sendo a mesma descartada após cada teste de polinização para evitar contaminação. Os testes de polinização cruzada foram preferencialmente realizados entre indivíduos espaçados, dos diferentes agrupamentos (G1, G2, G3 e G4).





**Figura 2.2.** Flores dos morfotipos de *Epidendrum ibaguense*: A- Semialba, B- Rósea, C- Magenta, D- Vermelha.

*Atividade de laboratório* – Os frutos resultantes dos testes de polinização foram coletados e conservados em FAA (formaldeído, ácido acético e etanol) 50%. Posteriormente, no laboratório de Citogenética da Universidade Federal do Ceará, foi analisada a viabilidade das sementes de nove frutos formados a partir de polinização cruzada, 11 frutos de autopolinização e dois frutos naturais. Para a contagem das sementes foi utilizada uma amostra de sementes que foi homogeneizada em 1mL de água destilada. Em seguida, transferiu-se uma gota deste material para lâmina, onde com auxílio de microscópio óptico e contadores manuais determinou-se uma amostra mínima de 300 sementes. A partir desta amostra foi estimado o total de sementes do fruto. As sementes foram consideradas viáveis quando possuíam embrião e este era vigoroso (Fig. 2.3-A).



**Figura 2.3.** Sementes de *Epidendrum ibaguense* em aumento de 10X em microscópio óptico. Em A, verifica-se uma semente viável com embrião robusto e, em B, uma semente inviável com embrião atrofiado.

Para determinar o sistema reprodutivo foi utilizado o índice de autoincompatibilidade (IAI), obtido utilizando a equação de Bullock (1985) adaptada. O índice é calculado a partir das médias em porcentagem de viabilidade das sementes de autopolinização (a), dividido pela taxa de viabilidade de sementes em polinização cruzada (b) vezes 100 ( $IAI = (a/b) \times 100$ ). Quando o índice é  $< 25\%$ , a espécie é considerada autoincompatível.

Utilizando o programa *BioEstat* 5.0 foi realizada a Análise de Variância – ANOVA, e posteriormente a comparação das médias através de teste de *Tukey* a 5% de significância.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Fenologia

A população observada de *E. ibaguense* apresentou dois períodos de floração. O primeiro pico de floração ocorreu em fevereiro de 2014, com 100% dos indivíduos marcados estavam em floração, sendo que a taxa de frutificação foi de apenas 22%. Em setembro de 2015 iniciou o surgimento de novos escapos, e entre outubro e novembro houve o surgimento de botões florais e o início da floração, o segundo pico de floração ocorreu em dezembro de 2015. Finalmente, entre janeiro e fevereiro observou-se a sobreposição da floração e frutificação nos indivíduos de *E. ibaguense*. Porém, nesta floração não foi possível determinar o percentual de formação de frutos para os indivíduos amostrados devido à interferência de fatores externos, uma vez que se trata de uma trilha turística e que havia criação de gado pelos moradores locais, as marcações numéricas dos indivíduos foram removidas. Quanto aos

morfotipos, estes não apresentaram variação no período de floração, havendo sincronia na floração da população e entre os morfotipos.

### 3.2. Morfologia

*Epidendrum ibaguense* é uma espécie rupícola/terricola, de folhas coriáceas, dísticas, com variação na coloração desde verde aos tons de roxo, medem em média  $5,8 \pm 1,5$  cm e apresentam bainha envolvendo o caule fino e ereto. As flores são formadas por três sépalas ( $14,2 \pm 1,4$  mm), duas pétalas ( $14,3 \pm 1,6$  mm) e um labelo trilobado franjado ou lacerado, adnado da coluna para o ápice medindo em média  $18,7 \pm 1,8 \times 12,2 \pm 1,9$  mm. Estão dispostas em uma haste de  $65 \pm 36,8$  cm em inflorescências do tipo umbela, contendo até oito flores. Apresentam uma coloração altamente variada, podendo ser encontrada desde a tonalidade semialba à vermelha (Fig. 2.2). Os frutos de *E. ibaguense* constituem-se como cápsulas elipsoides, os quais, quando maduros mostram-se em coloração rósea.

Foram registradas variações nas características morfológicas entre os morfotipos (Tab. 2.1). Em relação às características vegetativas o morfotipo vermelho apresentou o menor comprimento das folhas e a maior variação ( $51,6 \pm 20,9$  mm). Estatisticamente não houve diferença significativa entre o comprimento das folhas dos morfotipos. Porém a espessura das folhas mostrou uma diferença significativa do morfotipo semialba em relação aos demais morfotipos. Quanto ao comprimento da haste da inflorescência, os indivíduos com flores semialbas apresentaram as menores medidas ( $41,8 \pm 15,7$  mm), observando-se diferença estatística entre os morfotipos semialba e vermelho.

Em relação às características florais (Tab. 2.2) o morfotipo semialba apresentou as menores medidas do comprimento das sépalas e pétalas, respectivamente  $13,1 (\pm 1,1)$  mm e  $12,8 (\pm 1,0)$  mm. Destacando que a variação entre comprimento das sépalas e pétalas entre os morfotipos semialba e vermelha apresentam variação estatística significativa. O comprimento da coluna foi à característica com maior variação estatística entre os morfotipos, onde se observou a formação de três agrupamentos, porém mantendo a diferença entre os morfotipos semialba e vermelho. Em relação ao o labelo das flores houve variação significativa apenas em relação à largura, onde mais uma vez o morfotipo semialba apresentou as menores medidas ( $8,7 \pm 0,2$  mm) e permanece a variação significativa entre os morfotipos semialba e vermelha e rósea.

**Tabela 2.1.** Dimensões médias das estruturas vegetativas das folhas e hastes de *E. ibaguense* na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil.

Cor dos morfotipos	Folha (mm)		Haste (cm)
	Comprimento	Espessura	Comprimento
Semialba	59,4(±9,9)a	1,3(±0,3)b	41,8(±15,7)b
Rósea	61,6(±12,4)a	2,4(±0,3)a	57,0(±19,8)ab
Magenta	61,5(±16,7)a	2,6(±0,3)a	74,1(±29,9)ab
Vermelha	51,6(±20,9)a	2,5(±0,6)a	83,7(±56,3)a

\*Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística, a 5% de significância pelo teste de Tukey.

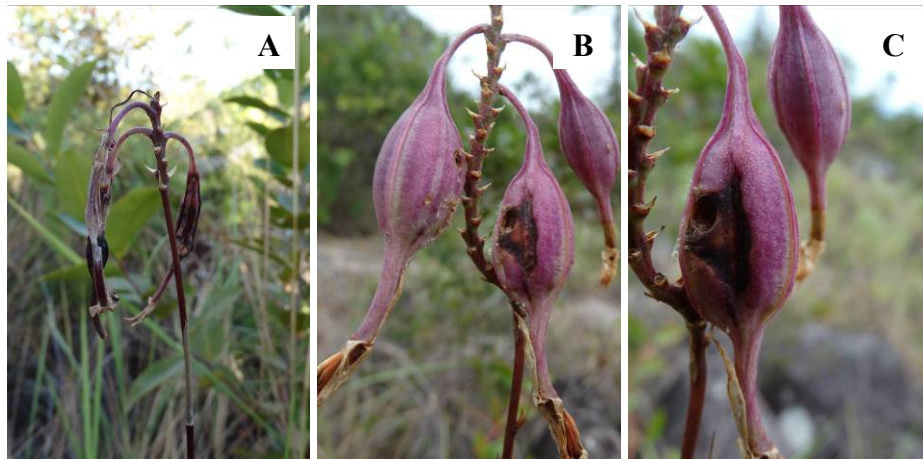
**Tabela 2.2.** Dimensões médias das estruturas das flores de *E. ibaguense* na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil.

Cor dos morfotipos	Comprimento (mm)				Largura (mm)
	Sépala	Pétala	Coluna	Labelo	Labelo
Semialba	13,1(±1,1)b	12,8(±1,0)b	13,0(±0,8)c	18,6(±0,8)a	8,7(±0,2)b
Rósea	14,7(±1,7)ab	14,8(±1,7)a	12,3(±2,5)ab	18,2(±1,5)a	10,2(±0,8)a
Magenta	13,7(±1,2)ab	14,2(±1,8)ab	13,5(±1,6)ac	19,0(±1,6)a	9,4(±1,0)ab
Vermelha	14,8(±1,3)a	14,7(±1,1)a	10,0(±0,7)b	19,1(±0,9)a	9,7(±0,4)a

\*Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística, a 5% de significância pelo teste de Tukey.

### 3.3. Sistema reprodutivo

Do total de indivíduos em que foram realizados os cruzamentos, 49% apresentam coloração magenta, 41% rósea e apenas 5% vermelha ou semialba. Este percentual de coloração reflete a dominância dos indivíduos magenta e rósea nos agrupamentos de indivíduos de *E. ibaguense*, morfotipos semialba foram encontrados apenas nos agrupamentos G3 e G4 e os morfotipos vermelho em G1 e G4. Dos testes de autopolinização, quatro foram abortados no primeiro mês e sete nos meses subsequentes, totalizando 11 abortos. Enquanto, os testes de polinização cruzada, a quantidade de abortos registrados foi de 17 no primeiro mês e oito posteriormente, totalizando 25 abortos. Além de abortos, foram registrados predação dos frutos, como o observado na figura 2.4. Os teste de polinização cruzada entre morfotipo também resultou em abortos. Com isso, a taxa de formação de frutos por autopolinização foi de 68% e de polinização cruzada foi de 30%.



**Figura 2.4.** Frutos de *Epidendrum ibaguense*: abortado (A) e predados (B-C) na Serra do Tepequém, Roraima, Brasil.

#### 3.4. Viabilidade de sementes

Os frutos de polinização cruzada apresentaram um percentual de 80% das sementes viáveis, já nas sementes dos frutos formados a partir de autopolinização a viabilidade foi de 69%. Os frutos naturais apresentaram 90% das sementes viáveis. Utilizando-se a equação adaptada de Bullock (1985), encontrou-se o valor de IAI igual a 86,6%. Portanto, conclui-se que *E. ibaguense* trata-se de uma espécie autocompátível.

Os resultados da ANOVA para viabilidade das sementes mostraram que a média de sementes viáveis em frutos de polinização cruzada e de autopolinização apresentam diferenças significativas da média obtida para as sementes inviáveis ( $F < 0,0001$ ). Finalmente, quando comparada à média entre sementes viáveis dos frutos de polinização cruzada, autopolinização e natural não mostraram diferença significativa ( $F < 0,0760$ ).

**Tabela 2.3.** Dados obtidos para *Epidendrum ibaguense* na Serra do Tepequém, Roraima.

	Autopolinização	Polinização cruzada	Natural
Formação de frutos	68% (N= 36)	30% (N= 36)	22% (N= 41)*
Viabilidade das sementes	69,1% (N= 11)	80% (N= 9)	90,7% (N= 2)

\*Taxa frutificação determinada apenas em uma população (G4).

#### 4. DISCUSSÃO

O estudo fenológico possibilita o entendimento das estratégias adaptativas identificadas nas espécies de plantas em um tipo particular de ecossistema. O baixo percentual de formação de frutos naturais na população estudada pode ser indicativo de perturbações antrópicas na Serra do Tepequém.

A população de *E. ibaguense* estudada encontra-se em um *Tepuy*, terminologia de origem indígena, adotada para montanhas com cumes em forma de mesa. Os *Tepuy*, apesar da riqueza e diversidade florística, além do elevado índice de endemismo, ainda são relativamente pouco estudados no Brasil (Borges et al., 2013).

Variações na morfologia floral de *Epidendrum* têm sido registradas, principalmente, em decorrência da hibridização entre espécies simpátricas (Pansarin, Amaral, 2008a, 2008b, Pinheiro et al, 2009, Pinheiro et al, 2010, Pinheiro, Cozzolino, 2013). Portanto, a hibridização é considerada um fator que influencia na diversificação deste gênero possibilitando, assim que *Epidendrum* seja um modelo em potencial para o estudo de questões evolutivas (Pinheiro, Cozzolino, 2013). Variações fenóticas intraespecíficas são menos relatadas na literatura, porém existem registros da ocorrência destas variações em *E. fulgens*, *E. densiflorum* e *E. secundum* (Pinheiro, Barros, 2007, Pinheiro, Cozzolino, 2013).

O estudo de caso de *E. secundum* descreve a ocorrência de variação morfológica entre populações e dentro da população (Pinheiro, Barros, 2007). Segundo Pinheiro e Barros (2007), as características mais importantes para definir padrões de agrupamento em *E. secundum* foram o comprimento das folhas, a largura do labelo, o comprimento da coluna e a largura do lóbulo central do labelo. Nas análises morfológicas de *E. ibaguense*, variações nas características de comprimento da folha e da largura do labelo diferiram principalmente para os indivíduos de flores com coloração vermelha, que apresentaram as menores medidas para estes caracteres.

O labelo é uma importante estrutura floral, tendo sido tradicionalmente utilizado para delimitar espécies, por exemplo, do complexo de *E. secundum* (Brieger, 1977, 1978, Pabst e Dungs 1975, 1977, Sastre 1990a, 1990b). Em *E. ibaguense* identifica-se uma variabilidade na forma e no tamanho desta estrutura, corroborando com as conclusões de Pinheiro e Barros (2007) em seu estudo, onde os caracteres que mostraram variabilidade entre populações, bem

como em uma única população, devem ser usados com cautela como caracteres para definição de grupos na taxonomia de espécies de *Epidendrum*.

Estudos de diferenciação intraespecífica em características florais e seu potencial adaptativo são cruciais para a compreensão da ligação entre micro e macro evolução de traços florais (Herrera et al., 2006, Hodgins, Barrett, 2008). Contudo, poucos estudos têm evidências confiáveis para a diferenciação intraespecífica adaptativa em características florais (Herrera et al., 2006). Mesmo em *Epidendrum*, um gênero altamente diversificado e modelo potencial para a compreensão da diferenciação intraespecífica em características florais, existem lacunas no conhecimento que refletem as dificuldades associadas à comprovação de que as divergências florais entre populações co-específicas\* de plantas seja um processo adaptativo (Pinheiro, Cozzolino, 2013). A adaptação às características ambientais, seja estas de natureza biótica ou abiótica, é um passo evolutivo importante, do qual presume-se a precedência da diversificação floral na especiação deste grupo (Galen, 2000, Johnson, 2006, Patterson, Givnish, 2004).

Os sistemas de reprodução influenciam fortemente a variabilidade genética de espécies vegetais, sendo considerado um ponto chave na biologia da conservação (Hamrick, Godt, 1990). O gênero *Epidendrum* abrange um vasto repertório de sistemas reprodutivos que variam desde a autoincompatibilidade à autogamia (Hágsater, Arenas, 2005). Os resultados dos testes para avaliação do sistema reprodutivo em *E. ibaguense* são interessantes, uma vez que se pode considerar o baixo sucesso reprodutivo decorrente de polinização cruzada como um indício da diferenciação entre indivíduos da mesma população, e, por conseguinte, pelo surgimento de barreiras reprodutivas entre estes indivíduos.

Krahl et al. (2015), em uma revisão de Orchidaceae, sugere que mesmo com o grande número de trabalhos existentes há muito ainda a ser descoberto, principalmente em espécies de orquídeas amazônicas; as quais, possivelmente, contribuirão para o entendimento dos processos evolutivos que atuam sobre este grupo tão diverso de vegetais.

## 5. Conclusões

A partir da análise das características morfológicas vegetativas e, principalmente, florais dos morfotipos de *E. ibaguense* determinou-se variações significativas entre os

\*Populações co-específicas – de mesmo taxa ou espécie.



morfotipos semialba e vermelho. Enquanto que, os morfotipos magenta e rósea apresentam um contínuo com estes morfotipos.

Considerando as variações morfológicas e o sistema reprodutivo autocompátivel em *E. ibaguense* esses resultados apontam indícios de especiação na população estudada na Serra do Tepequém.

## 6. AGRADECIMENTOS

Financiamento Capes e FAPEAM.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Borges, S.H., Moreira, M.; Vicentini, A., Cid, C.A., Cohn-Haft, M., Ribas, C., Capurucho, J.M.G., Cornelius, C., Santos, M.P. 2013. Muito além das florestas: Outros nichos de biodiversidade na Amazônia. *Revista Ciência Hoje* 306(51): 33-36.

Barbosa, R.I.; 1997. Distribuição das Chuvas em Roraima. In: Barbosa, R.I.; Ferreira, E.J.G.; Castellón, E.G. (Eds.) *Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima*. Ed. INPA. Manaus, pp. 325-335.

Brieger, F.G. 1977. Gattungsreihe Epidendra. Pp. 509–549, in: Schlechter, R., *Die Orchideen*, vol. 3, ed. F.G. Brieger, R. Maatsch & K. Senghas. Berlin: Parey.

Brieger, F.G. 1978. Über einige interessante Epidendrum-Arten der Subgenus Amphiglottium-Schistochila. *Orchidee (Hamburg)* 29: 52–60.

Bullock, S.H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous Forest. *Biotropica* 17: 287-301.

Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L., Freudenstein, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (eds). *Orchid conservation*. Natural History Publications: Sabah, 69-89.



Flora do Brasil 2020 em construção. 2016. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11518>>. Acesso em: 21 Mar. 56

Galen, C. 2000. High and dry: drought stress, sex-allocation trade-offs, and selection on flower size in the alpine wildflower *Polemonium viscosum* (Polemoniaceae). *American Naturalist* 156, 72–83.

Govaerts, R., Bernet, P., Kratochvil, K., Gerlach, G., Carr, G., Alrich, P., Pridgeon, A.M., Pfahl, J., Campacci, M.A., Baptista, D.H., Tigges, H., Shaw, J., Cribb, P. George, A., Kreuz, K., Wood, J. 2017. World Checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanical Gardens, Kew [online]. Available from <http://apps.kew.org/wcsp/>.

Hágsater, E., Arenas, M.A.S. 2005. *Epidendrum* L. In: Pridgeon, A.M., Cribb P., Chase, M.W., Rasmussen, F.N. (eds) *Genera Orchidacearum*. v.4. Oxford University Press, Oxford, pp 236-251.

Hamrick, J.L., Godt, M.J. 1990. Allozyme diversity in plant species. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer, Sunderland. Pp. 43-63.

Herrera, C.M., Castellanos, M.C., Medrano, M. 2006. Geographical context of floral evolution: towards an improved research programme in floral diversification, in: *Ecology and Evolution of Flowers*. Harder, L.D., Barrett, S.C.H. (eds). Oxford University Press, Oxford. pp. 278–294.

Hodgins, K.A., Barrett, S.C.H. 2008. Geographic variation in floral morphology and style-morph ratios in a sexually polymorphic daffodil. *American Journal of Botany* 95, 5–195.

Hubbs, C.L. 1955. Hybridization between fish species in nature. *Syst. Zool.* 4: 1-20. In: Hudson D.H., Rupp R., Scornavacca C. 2010. *Phylogenetic Networks: Concepts, Algorithms and Applications*. Cambridge: Cambridge University Press.

Johnson, S.D. 2006. Pollinator-driven speciation in plants. In: *Ecology and Evolution of Flowers*. Harder, L.D., Barrett, S.C.H. (eds), Oxford University Press, Oxford. pp. 295–310.

Köppen, W. 1948. *Climatologia*. México, Buenos Aires, Ed. Fundo de Cultura Econômica.

Krahl, A.H., Krahl, D.R.P., Valsko, J.J., Holanda, A.S.S., Entringer-Júnior, H., Nascimento, J.W. 2015. Biologia reprodutiva e polinização em orquídeas: com ênfase em espécies 57 brasileiras e da região amazônica – uma revisão de literatura. *Natureza on-line* 13(3): 128-133.

Luz, J., Franco, J. 2012. *Orquídeas de Roraima*. Brasília: Embrapa. 184p.

Nicoletti, C., Fontana, A.P., Kollmann, L. 2015. Uma espécie de *Epidendrum* (Orchidaceae) originária da mata Atlântica do Espírito Santo. *Plant Ecology and Evolution* 148(1): 128-133.

Pabst, G.F.J., Dungs, F. 1975. *Orchidaceae Brasiliensis*. Vol. 1. Hildesheim, Kurt Schmersow.

Pabst, G.F.J., Dungs, F. 1977. *Orchidaceae Brasiliensis*. Vol. 2. Hildesheim, Kurt Schmersow.

Pansarin, E.R., Amaral, M.C.E. 2008a. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology* 10: 211–219.

Pansarin, E.R., Amaral, M.C.E. 2008b. Pollen and nectar as a reward in the basal epidendroid *Psilochilus modestus* (Orchidaceae: Triphoreae): a study of floral morphology, reproductive biology and pollination strategy. *Flora* 203: 474–483.

Patterson, T.B., Givnish, T.J. 2004. Geographic cohesion, chromosomal evolution, parallel adaptive radiations, and consequent floral adaptations in *Calochortus* (Calochortaceae): evidence from a cpDNA phylogeny. *New Phytologist*, 161: 253–264.

Pinheiro, F., Barros, F. 2007. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany* 25: 129-136.

Pinheiro, F., Macêdo, A., Salatino, A. 2009. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Syst Evol* 283:165–177.

Pinheiro, F., Barros, F., Palma-Silva, C., Meyer, D., Fay, M.F., Suzuki, R.M., Lexer, C., Cozzolino, S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Mol Ecol*, 19:3981–3994.

Pinheiro, F., Cozzolino, S. 2013. *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. TAXON 12 pp. 58

Sastre, C. 1990a. *Epidendrum* bambusifformes de Guadeloupe et de Martinique. 1a partie. Orchidophile (Asnières) 93: 149–158.

Sastre, C. 1990b. *Epidendrum* bambusifformes de Guadeloupe et de Martinique. 2a partie. Orchidophile (Asnières) 94: 197–201.

Silva, E.L.S. 1997. A vegetação de Roraima. In: Barbosa, R.I., Ferreira, E.J.G., Castellón, E.G. (Ed.) Homem, ambiente e ecologia no estado de Roraima. Manaus: INPA. p. 400-415.

Veloso, H.P. et al. 1975. Vegetação da folha NA.20, Boa Vista. In: BRASIL. Departamento Nacional da Produção Mineral. Projeto Radam. Folha NA-20 Boa Vista e parte das folhas.

### Capítulo 3 - Chromosome variations and diversity of *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) on the Tepequém's Tepuy, Roraima, Brazil

S.R. Nóbrega et al.

Chromosome variations and diversity of *E. ibaguense*

S.R. Nóbrega<sup>1\*</sup>, A.L.F. Coelho<sup>2</sup>, C.F. Verola<sup>3</sup>, I.R. Costa<sup>3</sup>, R. Vilaça<sup>4</sup>, F.J.F. Luz<sup>4</sup> and W.F. Araújo<sup>1</sup>

Genet. Mol. Res. 16 (3): gmr16039754

Received June 20, 2017

Accepted August 14, 2017

Published September 21, 2017

**ABSTRACT.** Studies addressing chromosome variations have elucidated many points regarding the taxonomy of the Orchidaceae. *Epidendrum* L. besides being one the largest orchid genera, present remarkable morphological, and inter- and intraspecific chromosome variations. Thus, based on a previous report on flower color variation in individuals of *E. ibaguense* (magenta, pink, white, and red), our aim was to determine its chromosome number and test whether this trait is associated with flower color variation in natural populations on the Tepequém's Tepuy, Roraima. Root apices were pre-treated with 8-hydroxyquinoline at 4°C for 24 h and subsequently submitted to conventional cytogenetic procedures. Slides with the best spreading and contraction of chromosomes were photographed under light microscopy. Chromosome number was determined by counting at least 10 mitotic metaphase cells per individual. The types of interphase nuclei were determined for 30 nuclei per individual. *E. ibaguense* presented intra- and interpopulation variation in chromosome number, with  $2n = 58, 72,$  and  $76$ . The chromosome number  $2n = 58$  was most commonly found in individuals with magenta, pink, and white flowers, while the remaining two chromosome numbers occurred mostly in red-flowered individuals. The types of interphase nuclei were associated with the chromosome number. Individuals with  $2n = 58$  presented a predominance of semi-reticulated nuclei, while in those with  $2n = 72$  and  $76$  the nuclei were predominantly non-reticulated. The dominance of dispolidy in *E. ibaguense* suggests that this cytotype provides this species with a territorial advantage and a higher reproductive success, possibly contradicting the polyploid hypothesis. Our results suggest that chromosome number may not represent a reproductive barrier in genus *Epidendrum*.

**Key words:** Chromosomes; Hybridization; Cytogenetics; Amazon; Orchids

## INTRODUCTION

Chromosome analyses provide strong support for plant biosystematics, especially when the variation is a key trait that helps to recognize the validity of a certain species (Stace, 1991). According to Guerra (1986) and Stace (1991), the divergence in chromosome number between morphologically close species can split distinct taxa, remarkably when the morphological variation is also present.

Thus, studies addressing chromosome variations have undoubtedly shed light into taxonomic statuses of the Orchidaceae, one of the largest Angiosperm families. Among the many genera composing this family, *Epidendrum* L. stands out with about 1500 described species (Chase et al., 2003). In *Epidendrum*, chromosome number can vary greatly, ranging from  $2n = 24$  in *E. fulgens* Brongn. to  $2n = 240$  in *E. cinnabarinum* Salzm. Despite such variation, chromosome number is currently known for only 3% of the *Epidendrum* species. Apart from these interspecific differences, chromosome number varies within a given species, and even between neighboring populations (e.g., *E. denticulatum* Barb.,  $2n = 38, 40$ ; *E. radicans* Pav. ex Lindl. Rodr.,  $2n = 40, 57, 60, 62, 64, 70$ ; and *E. xanthinum* Lindl.,  $2n = 28, 30, 40, 60$ , ca. 80) (Pinheiro et al., 2009; Felix and Guerra, 2010; Assis et al., 2013). The largest number of cytotypes is currently known for *E. secundum* Jacq., with  $2n = 28, 40, 48, 52, 68$ , and 80 (Pinheiro et al., 2009) or  $2n = 30, 42, 50, 54, 56, 58$ , and 84 (Assis et al., 2013). Additionally, in *E. secundum* the chromosomes also vary in size, revealing a strong karyotypic asymmetry and bimodality (Assis et al., 2013).

When compared to dysploidy, polyploidy is considered a major adaptive mechanism in plants, expanding their ecological and geographic distribution (Briggs and Walters, 1997). Along with hybridization, polyploidy is recognized as a key process in plant speciation (Rieseberg, 1997; Grant, 1981). Studies suggest that polyploid organisms, which have more than two genomes in the same nucleus, have increased adaptability to harsh environmental conditions, as well as being good colonizers (Ramsey and Schemske, 1998; Schifino-Wittmann, 2004; Fawcett and Van de Peer, 2010). Moreover, polyploidy is apparently related to subspecific morphological variation (Pinheiro and Cozzolino, 2013). In *Epidendrum*, besides chromosome number variations, morphological traits of the species also vary greatly (Dressler, 1993, 2005; Pinheiro and Barros, 2007; Pansarin and Amaral, 2008).

*E. ibaguense* Kunth. is distributed from Mexico to Bolivia, and is commonly found in rocky outcrops, at elevations ranging from 200 - 1000 m, both in the savannas and Rain forests

(Freitas, 2001; Luz and Franco, 2012; Flora of Brazil 2020, 2017). In Brazil, its distribution is limited to the North and Midwest regions, within the Amazon Domain (Tropicos.org domain, 2017; Flora of Brazil 2020, 2017). Individuals of *E. ibaguense* with different flower colors were reported on a “Tepuy” (Luz and Franco, 2012). This is a type of ancient, table-top Mountain with a particular flora (Alves et al., 2007). Based on this report, and given the great variation in chromosome number in genus *Epidendrum*, this study aimed 1) to determine the chromosome numbers, and 2) to test for an association between chromosome number and flower color variation in natural populations of *E. ibaguense* on the Tepequém’s Tepuy, municipality of Amajari municipality, Roraima.

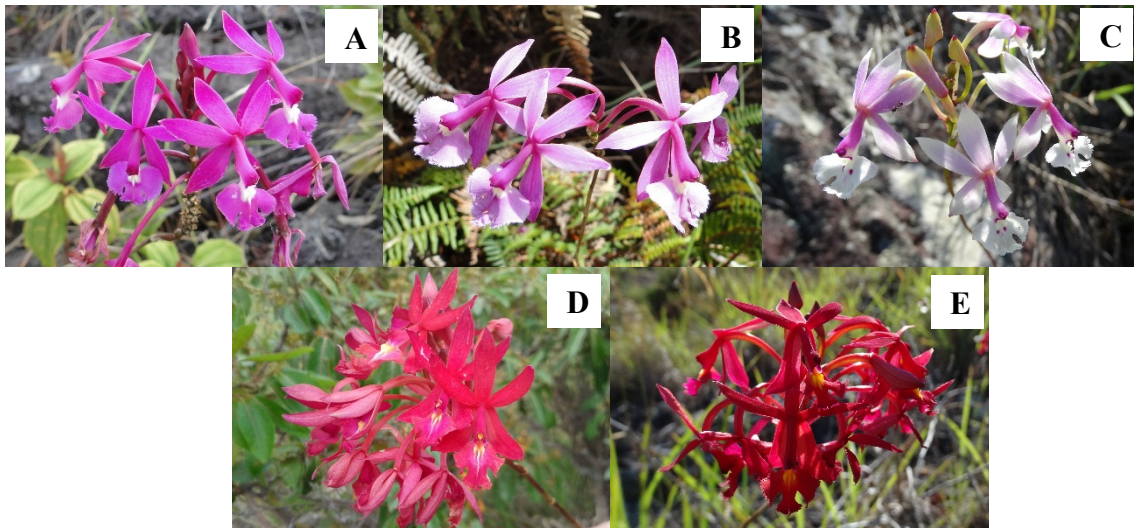
## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study site**

We collected individuals of *E. ibaguense* from the Tepequém’s Tepuy, in the municipality of Amajari/RR. The Tepequém’s Tepuy is a remain of an eroded sandstone plateau, reaching up to 1100 m. Its flora is composed mainly of grasses, shrubs, and subshrubs (Silva, 1997). The studied populations of *E. ibaguense* are located at the following coordinates: 3°45'56.96750"N and 61°42'09.59398"W, at 831 m (population 1), and 3°45'55.34681"N and 61°41'18.97437"W, at 1056 m (population 2).

### **Sample selection and collection**

To determine the chromosome numbers of *E. ibaguense*, we selected individuals with different flower colors: magenta and pink (the most common individuals), and red and white (rare individuals) (Figure 1). The morphological characterization of vouchers used in the cytogenetic analysis is shown in Table 1.



**Figura 3.1.** Flower color variation of *Epidendrum ibaguense* on the Tepequém's Tepuy/RR. **A.** magenta flowers; **B.** pink flowers; **C.** white flowers; **D.** terrestrial red flowers from population 1 (1); **E.** rupicolous red flowers from the population 2 (2).

### Chromosome analysis

We previously treated root apices of *E. ibaguense* with 8-hydroxyquinoline at 4°C for 24 h, and postfixed the samples in Carnoy (ethanol:acetic acid, 3:1) at 4°C. The root apices were hydrolyzed in 1 N HCl for 10 min at 60°C, smashed on glass slides, and stained with 2% Giemsa for 20 min (adapted from Guerra, 1988). We photographed those slides with the best spreading and contraction of chromosomes under a light microscope. We determined the chromosome number for at least 10 mitotic metaphases per individual, and the type of interphasic nuclei in 30 samples per individual.

**Table 3.1.** Morphological traits of the vouchers used in the cytogenetic analysis.

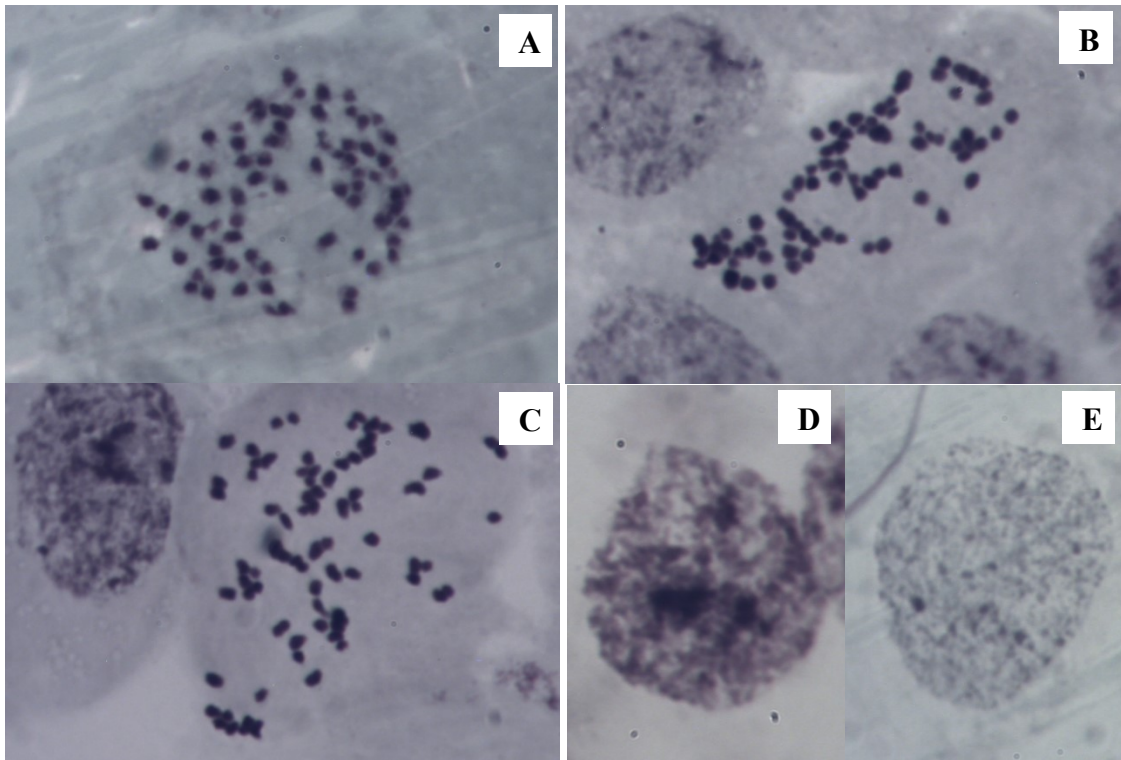
	Magenta		Pink	White	Red	
	1	2	2	2	1	2
Population	1	2	2	2	1	2
Leaf length	59.41	55.38	60.05	54.2	71.36	28.65
Leaf width	2.63	2.4	1.87	1.81	2.77	3
Inflorescence length*	65	113.75	78.5	36	137	25
Flower /Inflorescence	5F 8B	5F 8B	5F 9B	3F 6B	8F 18B	2F 4B
Sepal length	11.75	13.85	16.22	14.05	15.98	13.47
Petal length	16.42	13.26	17.44	13.77	15.75	15.03
Labellum length	19.7	18.99	18.13	19.27	19.54	19.37
Labellum diameter	14.94	11.36	12.51	11.47	10.45	10.28
Column length	9.49	8.69	11.95	9.07	10.05	9.98
Habit	Terrestrial	Rupicolous	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Rupicolous

Values are reported in millimeters, \*except for inflorescence length, which is in centimeters. F- Flowers and B- Buds.

## RESULTS

*E. ibaguense* presented intra- and interpopulation variation in chromosome number, with  $2n = 58$ ,  $72$ , and  $76$  (Figure 2), and  $2n = 58$  being most common in four individuals from both studied populations. This finding represents a valuable contribution to the cytogenetic status of *E. ibaguense* since  $2n = 70$  has been the only chromosome number report up to now (Pinheiro et al., 2009). At population 1, the terrestrial, magenta-flowered individual presented  $2n = 58$ , while the terrestrial, red-flowered individual sheltered in the shade presented  $2n = 72$ . At population 2, the rupicolous individuals with magenta, pink, and white flowers presented  $2n = 58$ , while rupicolous, red-flowered individuals exposed to the sunlight presented  $2n = 76$ . Moreover, in individuals with  $2n = 58$ , interphasic nuclei were predominantly semi-reticulated, whereas in those with  $2n = 72$  and  $76$  nuclei were predominantly non-reticulated.





**Figura 3.2.** Metaphasic cells of *Epidendrum ibaguense* showing condensed chromosomes. **A.**  $2n = 58$ , magenta-flowered morphotype; **B.**  $2n = 72$ , terrestrial, red-flowered morphotype (population 1); **C.**  $2n = 76$ , rupicolous, red-flowered (population 2). Type of interphasic nuclei: **D.** semi-reticulated; **E.** non-reticulated.

## DISCUSSION

In *E. ibaguense*, the chromosome number was first reported by Pinheiro et al. (2009). These authors determined  $2n = 70$  for individuals from Serra de Pacaraima, located on the border between Venezuela and Roraima. In our study, in both studied populations,  $2n = 58$  was the most frequent chromosome number, while  $2n = 72$  and  $2n = 76$  were less frequent. Therefore, in both populations of the Tepequém's Tepuy, diploid individuals of *E. ibaguense* ( $2n = 58$ ) may have greater reproductive and environmental success, as suggested by their higher local abundance. Our results suggest that in *E. ibaguense*, descendant and ascendant dispolyploid events may have caused the chromosome variation in this species on the Tepequém's Tepuy.

According to Felix and Guerra (2010), in the subfamily Epidendroideae, only five of the 128 genera present a stable number of chromosomes. *Epidendrum* is one of the few genera that present variation in chromosome number, including at the intraspecific level [e.g., *E. ciliare* L., *E. denticulatum*, *E. radicans*, *E. xanthinum*, and in the complex *E. secundum* (Tanaka and

Kamemoto, 1984; Pinheiro et al., 2009; Felix and Guerra, 2010; Assis et al., 2013) and *E. ibaguense* (this study)].

Such variation in chromosome number in *Epidendrum* suggests that determining a basic karyotype for this genus is uncertain, bringing about the difficulty in estimating the level of polyploidy and the karyotypic evolution in this taxon (Felix and Guerra, 2000). However, dysploidy (loss or gain of chromosomes) has been considered the most important evolutionary events in Orchidaceae (Felix and Guerra, 2010), while in plants as a whole, as well as in many orchid genera, polyploidy plays such a role (Felix and Guerra, 2000, 2005; Conceição et al., 2006).

It has been observed that highly polymorphic species are adapted to environmental conditions that impose strong selective pressures. Some groups within Orchidaceae that grow on inselbergs show levels of polyploidy higher than those related to epiphytic species (Felix and Guerra, 2010). In *E. cinnabarinum*, for instance, the intraspecific polyploidy seems to be related to the acquisition of the rupicolous habit (Felix and Guerra, 2010). Interestingly, this and other polyploid species are found in disturbed environments (Assis, 2009; Pinheiro et al., 2009; Felix and Guerra, 2010). Duplicated or repetitive gene sequence may provide a local advantage for polyploid organisms (Fawcett and Van der Peer, 2010). On the other hand, such a variation in chromosome number may not represent an effective reproductive barrier neither for *Epidendrum* nor the remaining groups of plants (Cozzolino et al., 2004; Marques et al., 2010).

*E. ibaguense* is phylogenetically close to the Andean clade, mainly distributed between the Andean Mountains and Guyana (Pinheiro et al., 2009; Pinheiro and Cozzolino, 2013). In Brazil, it is found exclusively in the Amazon, particularly on the studied Tepuy. Little is known about these types of mountains, and biological information concerning this orchid group is important to understand its evolution.

Flower color variation in *E. ibaguense* may be associated with the attraction of the different local groups of pollinators (Proctor and Yeo, 1973; Richards, 1996). In the Amazonian orchids, the most common flower colors are yellow, white, and lilac, which lie within the visible spectrum of bees (Ribeiro et al., 1999). Red flowers are invisible to bees and are uncommon in orchids (Faegri and Van der Pijl, 1979). According to Weiss (1995), flower color change evolved in response to a pollinator-driven selection, which may represent a

functional convergence in the angiosperms. Red-flowered individuals of *E. ibaguense* may be coevolving with a specific group of pollinators.

There are still knowledge gaps concerning Amazonian Orchidaceae, and, thus, much to be discovered about this family (Krahl et al., 2015). Moreover, studies addressing the origins of the tremendous diversity of *Epidendrum* are often constrained by the lack of model organisms capable of answering many fundamental questions about plant evolution (Pinheiro and Cozzolino, 2013). Therefore, punctual studies may fill such a gap about this orchid genus.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to CAPES and FAPEAM for Doctorate scholarship for SRN. This work is part of Doctorate's thesis of SRN at Network Biodiversity and Biotechnology of the Legal Amazon, UFRR.

### Funding

FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant nº 10582430-5 – Programa Primeiros Projetos) and CNPq to Itayguara Ribeiro da Costa (479263/2011-6 – Edital Universal 2011).

Authorization SISBIO 40111-1.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

## REFERENCES

Alves RJV, Cardin L and Kropf MS (2007). Angiosperm disjunction “Campos rupestres - restingas”: a re-evaluation. *Acta Bot. Bras.* 21(3): 675-685.

Assis FNM (2009). Variação numérica e evolução cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae). Available at: [<http://www.cca.ufpb.br/ppga/pdf/mestrado/Felipe%20Nollet-ms09.pdf>]

Assis FNM, Souza BCQ, Medeiros-Neto E, Pinheiro F, et al. (2013). Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. *Bot. J. Linn. Soc.* 172: 329-344.

Briggs D and Walters SM (1997). Plant variation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge.

Chase MW, Cameron KM, Barrett RL and Freudenstein JV (2003). DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (eds). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Sabah, 69-89.

Conceição LP, Oliveira ALPC and Barbosa LV (2006). Characterization of the species *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. (Epidendroideae: Orchidaceae) occurring in dunas do Abaeté-Salvador, BA-Brazil. *Cytologia* 71: 125-129.

Cozzolino S, D'Emérico S and Widmer A (2004). Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 271: 259-262.

Dressler R (1993). *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland.

Dressler R (2005). How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.

Faegri K and Van Der Pijl L (1979). *Principles of pollination ecology*. 3rd edn. Pergamon Press, London.

Fawcett JA and Van de Peer Y (2010). Angiosperm polyploids and their road to evolutionary success. *Trends Evol. Biol.* 1: 17-21.

Felix LP and Guerra M (2000). Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. *Genet. Mol. Biol.* 23: 957-978.

Felix LP, Guerra M (2010). Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 163: 234-278.

*Epidendrum* in Flora do Brasil 2020 em construção (2017). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB37569>]. Accessed April 18, 2017.

Freitas FL (2001). *Orquídeas na Amazônia*. Roraima: Boa Vista.

Grant V (1981). *Plant speciation*. Columbia University Press, New York.

Guerra M (1986). Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Rev. Bras. Genet.* 9: 21-40.

Guerra MS (1988). Introdução à Citogenética Geral. Guanabara, Rio de Janeiro.

Krahl AH, Krahl DRP, Valsko JJ, Holanda ASS, et al. (2015). Biologia reprodutiva e polinização em orquídeas: com ênfase em espécies brasileiras e da região amazônica - uma revisão de literatura. *Natureza on-line* 13: 128-133.

Luz FJF and Franco J (2012). Orquídeas de Roraima. Embrapa, Brasília.

Marques I, Nieto Feliner G, Draper D, Martins-Loução MA, et al. (2010). Unraveling cryptic reticulate relationships and the origin of orphan hybrid disjunct populations in *Narcissus*. *Evolution* 64: 2353-2368.

Pansarin ER and Amaral MCE (2008). Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) floral variation: A consequence of natural hybridization? *Plant Biol.* 10: 211-219.

Pinheiro F and Barros F (2007). Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nord. J. Bot* 25: 129-136.

Pinheiro F and Cozzolino S (2013). *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. *Taxon* 62: 77-88.

Pinheiro F, Koehler S, Corrêa AM, Salatino MLF, et al. (2009). Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.* 283: 165-177.

Proctor M and Yeo P (1973). The pollination of flowers. In: Handbook of experimental pollination biology (Jones CE and Little RJ, eds.). Scientific and Academic Editions, New York.

Ramsey J and Schemske DW (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 467-501.

Ribeiro JE, Hopkins MJG, Vincentini A, Sothers C, et al. (1999). Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central. INPA, Manaus.

Richards PW (1996). Trees and shrubs: II. Reproductive biology. In: The tropical rain forest: an ecological study (Richards PW, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 101-120.

Rieseberg LH (1997). Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 28: 359-389.

Schifino-Wittmann MT (2004). Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. *Rev. Bras. Agrociên.* 10: 151-157.

Silva ELS (1997). A vegetação de Roraima. In: Homem, ambiente e ecologia no estado de Roraima (Barbosa RI, Ferreira EJJ and Castellón EG, eds.). INPA, Manaus.

Stace CA (1991). Plant taxonomy and biosystematics. 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Tanaka R and Kamemoto H (1984). Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: Orchid biology: reviews and perspectives III (Arditti J, eds.). Cornell University Press, Ithaca.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden (2017). Available at: [<http://www.tropicos.org/Name/23504348>]. Accessed April 18, 2017.

Weiss MR (1995). Floral color change: a widespread functional convergence. *Am. J. Bot.* 82: 167-185. Available at: [<http://dx.doi.org/10.2307/2445525>].

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Serra do Tepequém é um Tepui brasileiro, apesar de ser um ecossistema importante ainda são pouco estudados. Esta tese é o primeiro levantamento da flora orquidofila realizado em um Tepui roraimense. A partir dos resultados determinou-se que a riqueza de Orchidaceae da Serra do Tepequém representa 10% do total de espécies de orquídeas do Estado de Roraima. Portanto, destacando a importância da realização de levantamentos florísticos em áreas pouco estudadas e destacando a vegetação singular em Tepuis.

Quanto a *Epidendrum ibaguense*, na população natural estudada as variações de colorações das flores foram: magenta, rósea, vermelha e semialba. Considerando a coloração para determinar os morfotipos observou-se variação nas características morfológicas vegetativas e florais, as quais determinaram variação significativa entre os morfotipos semialba e vermelho. Que quando associados aos resultados de número cromossômico apontam especiação uma vez que os morfotipos vermelhos apresentaram número cromossômico de  $2n= 72$  e  $76$ , enquanto que o número de cromossomos para os demais morfotipos foi  $2n= 58$ .

Estudos na Serra do Tepequém, principalmente, que contribuam para a determinação da biodiversidade local são necessários uma vez que se trata de uma região com alto potencial ecoturístico. Além disso, continuar as investigações em *E. ibaguense*, concluindo com o nível genético, é importante pois o gênero *Epidendrum* é um potencial modelo para entender processos evolutivos em espécies vegetais. Para isso, são necessários estudos que contribuam para análises macroambientais.